



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES Y LA FRECUENCIA DE
ALTERACIONES SOMÁTICAS DE MOSCAS
(*Drosophila melanogaster*) EXPUESTAS A
CONCENTRACIONES BAJAS DE GENOTÓXICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

JOSÉ JESÚS HERACLIO HERRERA BAZÁN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

México, D.F.

Marzo, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 03 de noviembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del alumno HERRERA BAZÁN JOSÉ JESÚS HERACLIO con número de cuenta 98533806 con la tesis titulada "COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y LA FRECUENCIA DE ALTERACIONES SOMÁTICAS DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A CONCENTRACIONES BAJAS DE GENOTÓXICOS.", realizada bajo la dirección de la DRA. PATRICIA RAMOS MORALES:

Presidente: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Vocal: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Secretario: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
Suplente: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI
Suplente: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de febrero de 2009.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de una Beca para Estudios de Posgrado No. 203492 y una Beca Mixta en el Extranjero para Becarios CONACYT Nacionales No. 203492; y del Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), UNAM No. EN206803.

Comité Tutorial:

Presidente:	Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet
Vocal:	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Secretario:	Dra. Patricia Ramos Morales
Suplente:	Dr. José Pedraza Chaverri
Suplente:	Dra. Patricia Guevara Fefer

AGRADECIMIENTOS

I. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

II. A los apoyos recibidos:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca para Estudios de Posgrado No. 203492 y una Beca Mixta en el Extranjero para Becarios CONACYT Nacionales No. 203492.

Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), UNAM No. EN206803

III. A los miembros del Comité Tutorial

Presidente: Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet

Vocal: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Secretario: Dra. Patricia Ramos Morales

Suplente: Dr. José Pedraza Chaverrí

Suplente: Dra. Patricia Guevara Fefer

A mi pequeña semilla,

Antonio Yolyo

A mi compañera,

Rosy

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A las personas que han hecho posible este trabajo:



Patricia Ramos Morales, Dra.
Universidad Nacional Autónoma de México



Kathleen Dixon, Ph.D.
The University of Arizona

A la gente que me ha apoyado con su amistad,

Miembros del Laboratorio de Genética y Toxicología
Ambiental, Facultad de Ciencias, UNAM, México

Miembros del Dixon Lab, Molecular and Cellular Biol.
Dept., The University of Arizona, EUA.

Salvador Navarro Rangel, P.de B.

Araceli Masterson , Ph.D.

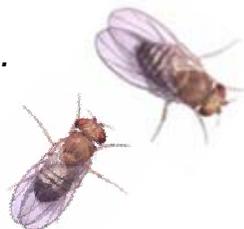
A mis familias,

Herrera Burgos

Herrera Bazán

Burgos Cháidez

A Drosophila melanogaster...



Este trabajo fue realizado en: el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental y la Unidad de Análisis Ambiental, de la Facultad de Ciencias, UNAM, México; Laboratorio de la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México; y Laboratorio de Kathleen Dixon, Ph.D., Molecular and Cellular Biology Department, The University of Arizona, Tucson, AZ, EUA.

El material biológico utilizado fue donado por: Banco de Moscas, UNAM: Cepas de *D.melanogaster* Canton-S, *flr³*, y *mwh,e*; y Thomas Bunch, Ph.D., Arizona Cancer Center, EUA: Línea Celular S2S de *D. melanogaster*.

Agradezco la valiosa asesoría técnica:

Cultivo celular: Joseph Ahlander, Ph.D., The University of Arizona, EUA.

Biología molecular: Jun Isoe, Ph.D., The University of Arizona, EUA.

Inmunocitoquímica: Rosa María Burgos Cháidez, M.inSc., The University of Arizona, EUA.

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análisis de varianza
ATP – Adenosin trifosfato
cDNA – Cadena complementaria de DNA
C-S – Moscas silvestres cepa Canton-S
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DSB – Rompimiento de doble hebra de DNA
DT – Hidrosulfito de sodio
E.E. – Error estándar
GR – Glutación reductasa
GSH – Glutación reducido
GSH1 – γ -glutamil-cistenil sintetasa
GSH2 – Glutación sintetasa
GSH-Px – Glutación peroxidasa
GSSG – Glutación oxidado; Glutación disulfuro
GST – Glutación transferasa
H2A.x – Histona H2A.x
H₂O₂ – Peróxido de Hidrógeno
IFC – Índice de fertilidad corregido
ISX – Índice de sobrevivencia
MANOVA – Análisis de varianza multivariado
min – minuto
NADPH – Nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato
NEM – N-Etilmaleimida
OH[•] – Radical hidroxilo
OPT – o-phthaldialdehido
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
Prom. – Media aritmética
RNA_m – Ácido ribonucleico mensajero
ROS – Especies reactivas de oxígeno
S2S – Línea celular 2 de Schneider
SMART – Prueba de mutación y recombinación somática en *D. melanogaster*
SSB – Rompimiento de una hebra de DNA
TNF- α – Factor de necrosis tumoral alfa
Trx – Tioredoxina
TrxPx – Tioredoxina peroxidasa
TrxR – Tioredoxina reductasa

Índice

	Pag.
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
<i>Drosophila melanogaster</i>	11
Talidomida	15
Estrés Oxidante	21
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVO	26
HIPÓTESIS	27
METODOLOGÍA	28
Experimentos <i>in vivo</i>	29
Experimentos <i>in vitro</i>	34
RESULTADOS	38
Experimentos <i>in vivo</i>	39
Experimentos <i>in vitro</i>	45
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	60
ANEXO I. SOLUCIONES	67
ANEXO II. METODOLOGÍA	69

Resumen

La investigación en mutagénesis se ha enfocado a estudiar el efecto de dosis altas de posibles mutágenos a pesar de que muchos estudios han mostrado que las respuestas de los sistemas biológicos en concentraciones altas no pueden extrapolarse a concentraciones bajas cercanas a las ingeridas por los pacientes pues la respuesta en concentraciones bajas no es lineal y algunas veces es contraria. La talidomida es bien conocida por inducir focomelia en bebés cuando se ingiere en la semanas 1 a 3 del embarazo. Este fármaco es una mezcla racémica de enantiómeros con una estructura lipofílica susceptible a hidrólisis y sus efectos más conocidos son la inmunomodulación y la antiangiogénesis, sin embargo, también está relacionada con cambios en receptores membranales en leucocitos, con la inhibición de quimiotaxis en neutrófilos y con la endocitosis en células polimorfonucleares. Actualmente es utilizada en diversos países para el tratamiento de lepra así como diversos tipos de cáncer a pesar de que su mecanismo de acción no se ha esclarecido. La molécula de talidomida es espontáneamente hidrolizada de forma no enzimática en condiciones fisiológicas, sólo cerca del 1% del compuesto administrado oralmente en humanos es excretado sin metabolizar y se ha estimado que se producen más de 100 metabolitos derivados de su hidrólisis (Xinuy, 1999). Diversos autores sugieren que su mecanismo de acción está relacionado con su hidrólisis que genera oxirradicales libres que oxidan macromoléculas celulares. Se sabe que talidomida tiene actividad mutagénica en *Salmonella* (MacKenzie, 1983), actúa como análogo de Guanina (Huang *et al.*, 1997); su anillo glutaramido puede unirse a DNA desnudo de embriones de ratas (Huang *et al.*, 1990); y tiene actividad mutagénica a bajas concentraciones en *Drosophila melanogaster* (Ramos-Morales, 2005). Sin embargo, Ashby (1997) en un estudio multidisciplinario en 32 bioensayos sólo en línea somática en varios phyla utilizó concentraciones mayores a las solubles de este fármaco en agua y lejanas de la concentración sanguínea máxima en humano y publicó la ausencia de mutagenicidad. El objetivo del presente trabajo es estudiar la relación entre la frecuencia de alteraciones somáticas y el estado redox celular *in vitro* e *in vivo* en *Drosophila melanogaster* expuestas a talidomida. La hipótesis es que el estrés oxidante generado por la hidrólisis de la talidomida produce cambios bioquímicos en el estado redox celular relacionados con la frecuencia de alteraciones somáticas de organismos tratados con talidomida. Las larvas de 72 ± 2 h de edad de *Drosophila melanogaster* (C-S y SMART) y células de la línea S2S fueron expuestas a 0, 0.156 y 156 μM de talidomida durante 30 y 180 minutos. Se evaluó el cambio en 8 variables de respuesta de parámetros biológicos *in vivo* en las moscas (sobrevivencia, fertilidad, teratogénesis, contenido de proteína, de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado (GSSG) en moscas silvestres y sobrevivencia, mutación y recombinación somática en moscas SMART) y en 5 variables de respuesta *in vitro* en la línea celular S2S (viabilidad celular, contenido de proteína, de GSH, de GSSG y la proporción de células positivas en inmunotinción para la histona H2A.X). La talidomida no mostró ser letal ni citotóxica en las concentraciones y tiempos de tratamientos probados, así como tampoco modificó el contenido total de proteína en moscas ni en células S2S. La exposición a una concentración baja de talidomida modificó la frecuencia de mutación y recombinación somática en moscas, incrementó el contenido de la forma reducida y oxidada de Glutatión en células S2S, modificó la fertilidad en moscas y la frecuencia de malformaciones. La exposición a talidomida indujo rompimientos de doble hebra de DNA en células S2S. La talidomida en bajas concentraciones produjo cambios en el estado redox celular, posiblemente por su hidrólisis espontánea, relacionados con aquellos en la frecuencia de las alteraciones somáticas en *Drosophila melanogaster*. Estos resultados contribuyen a la comprensión del estrés oxidante como un mecanismo probable de acción de la talidomida y evidencian la urgencia de estudios y políticas que permitan la evaluación y el establecimiento del riesgo humano por el uso de talidomida ante el creciente uso de este medicamento en el tratamiento de diversas enfermedades sin existir lineamientos de edad, vías de administración, dosis y duración del tratamiento.

Abstract

Research on mutagenesis has been directed to determine the effect of chemicals on biological systems. Commonly, the expectations about the effect of low doses of genotoxins on biological systems are based on the effect produced using high doses of them. However, experimental reports showing that the curve doses-effect is no linear when low doses are assayed are increasing. Thalidomide (Thl) is a well known drug by the induction of phocomelia on babies when ingested by the mother between the first and third pregnancy week. This drug is a racemic mixture of enantiomers with a lipophilic structure extremely prone to hydrolysis. Thl is associated to immunomodulation and antiangiogenesis, nonetheless, it's also related with changes in leukocyte membrane receptors, neutrophile chemotaxis inhibition and polymorphonuclear cell endocytosis. Currently is used on diverse countries as leprosy treatment as well as for diverse cancers regardless its complex mechanism of action has not been solved. Thalidomide molecules are hydrolyzed by spontaneous non-enzymatic ways at physiological conditions. More than a hundred metabolites are produced as derivatives from the hydrolytic process and only near 1% of the orally administered compound on humans is unmetabolized excreted. It has been proposed that reactive oxygen species formed during Thl hydrolysis could be the main mechanism of action implied in its genotoxicity. Mutagenic activity of Thl has been reported in Salmonella (Mackenzie, 1983). Thl is a Guanidine analogue (Huang, 1997), and its glutaramide ring can join rat embryo naked DNA (Huang and McBride, 1997), in addition, it shows mutagenic at low concentrations in Drosophila melanogaster (Ramos-Morales et al., 2005). Nevertheless, in 1997 Ashby commanded a multidisciplinary group which, using 32 bioassays at somatic cell lines from different organization level organisms, assayed Thl in a wide range of concentrations (that at the upper limit inclusive exceeded the solubility ratio Thl/dissolvent) lead to the conclusion that Thl lack of mutagenic activity. The goal of present work is to determine the relationship between somatic alterations frequency and the cell oxidant status from in vitro and in vivo systems from Drosophila melanogaster. The hypothesis assayed implies that molecular changes on the cellular redox state produced by ROS arising from Thl hydrolysis will modify too with the frequency of somatic alterations in Drosophila melanogaster flies treated with Thl. Drosophila larvae aged 72 ± 2 h (Wild type, C-S) and from the standard SMART cross (SMART flies) and S2S cells were exposed to three Thl concentrations being 0, 0.156, 156 μM over two length time periods, 30 and 180 minutes. The treatment effect was scored for eight biomarkers. The in vivo biomarkers scored on C-S flies were Survival Index, Fertility, Teratogenesis induction, Protein Quantity, Reduced Glutathione Quantity (GSH) and Oxidized Glutathione (GSSG) meanwhile Survival Index, Somatic Mutation and Mitotic Recombination induction were evaluated on SMART flies. The S2S cell line was used to determine the in vitro effect of Thl treatment on Cell Viability, in the Protein, GSH and GSSG levels and the proportion of positive cells after immunostaining for phosphorylated histone H2A.X. Thl failed to show toxic or cytotoxic at the concentrations and exposure times assayed. In whole flies and S2S cells from control and treated cultures the total protein content was similar. Low concentrations of Thl affected the Fertility, increased the frequency of Somatic Mutation and Mitotic Recombination and induced malformations in flies exposed during development. In S2S cells, Thl increased the content of GSHH and GSSG and induced DNA double strand break but also changed the cell oxidative state leading to changes at the biological parameters assayed. Oxidative stress arising from the Thl spontaneous break is related with the Frequency of somatic alterations in flies exposed to low concentrations of Thl. Data obtained contribute to the comprehension of oxidative stress as a probable mechanism of action implied in the Thl effects. More studies to explore the effect of low concentrations of drugs as Thl need to be performed. In addition, alternative strategies should be developed in order to distinguish false negative responses as that associated to Thl and allow the assessment of the human risk associated with the exposure to Thl. The challenge is avoid more detrimental effects on the progeny of patients treated with Thl.

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos estamos expuestos naturalmente a numerosos agentes físicos, químicos y biológicos que pueden alterar en corto o largo plazo nuestros sistemas fisiológicos, bioquímicos y genéticos causando enfermedades o la muerte. Muchas patologías humanas como el cáncer, resultan de cambios genéticos heredables debidos a la exposición a agentes genotóxicos, especialmente mutágenos. En 1927 Müller comenzó los estudios de mutagénesis al inducir con rayos X mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* (Müller, 1927). La mutagénesis química ha utilizado un modelo clásico dosis-respuesta que asume un efecto mayor a una concentración mayor (Casarett y Doull, 1975) y por tanto se ha enfocado al análisis del efecto de rangos de concentraciones altas cercanas a los límites de solubilidad de las sustancias o a Dosis Letales 50 (LD50), dejando de lado a las concentraciones bajas. Sin embargo, una dosis que mata a la mitad de los organismos (LD50) no es la mejor para el establecimiento de riesgos y en muchos casos, estas concentraciones son muy lejanas de la concentración real ingerida por los pacientes y de las concentraciones presentes en el ambiente a las que los organismos estamos expuestos. Muchos estudios han mostrado que la respuesta a concentraciones bajas de algunos compuestos no es lineal e incluso algunas veces resulta contraria a los resultados obtenidos en concentraciones altas (Stebbing, 1997; Calabrese y Baldwin, 1998 a; Calabrese y Baldwin, 2001). Para algunos compuestos como As, Cr, Cu, Hg, Zn ó Pb, la respuesta en concentraciones bajas no puede ser predicha por las observaciones hechas a concentraciones altas (Calabrese y Baldwin, 1998 b).

Drosophila melanogaster

Por muchos años, *Drosophila melanogaster* conocida comúnmente como mosca del vinagre o de la fruta, se ha empleado como organismo modelo para la identificación de mutágenos ambientales. *Drosophila* (Orden Díptera, Familia Drosophilidae) es uno de los géneros eucariontes más estudiados desde el punto de vista genético y agrupa a alrededor de 900 especies. Esta mosca es un pequeño díptero de color café claro de aproximadamente 2 mm de largo, con cabeza, tórax y abdomen claramente distinguibles, probóscide de succión retraíble y ojos rojos compuestos prominentes, un par de alas articuladas con 7 regiones principales definidas por nervaduras y un patrón con bandas oscuras en el abdomen. Las hembras presentan mayor tamaño, siete placas abdominales (terguitos) y placa vaginal claramente distinguible. Los machos son más pequeños, poseen 5 terguitos, pene retraíble y peines sexuales en el primer par de patas usados durante el cortejo y la cópula.

Ciclo de vida y desarrollo larvario

D. melanogaster es un insecto holometábolo y presenta 4 estadios en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto con una duración de 10 días (25°C, 60% Humedad) (Ashburner y Thompson, 1978) (**Fig.1**). El huevo dura aproximadamente 24 h y de él emerge una pequeña larva que crece definiendo tres estadios larvarios. En el tercer estadio que se alcanza a las 72 h de edad, la larva presenta activas la mayoría de sus rutas metabólicas (Hällström y Grafström, 1981; Hällström *et al.*, 1981) y al término de este estadio a las 120 h de edad, la larva forma una pupa. Durante la pupación se produce la histólisis de la mayoría de los tejidos larvarios y continúa la diferenciación y organización de las respectivas estructuras del adulto a partir de paquetes celulares determinados desde el desarrollo larvario (discos imagales).

En el caso del ala, el conjunto inicial de células embrionarias a partir del que se iniciará la formación del disco imagal, consta de 30 células en dos compartimentos (antero-posterior). Al emerger la larva de primer estadio (24 h de edad), el disco imagal de ala se halla formado por 50-100 células y después de un periodo de estabilidad mitótica, la proliferación celular se reanuda al final del primer periodo larval (24 h después de la eclosión) y continuará hasta 24 h después de la formación de la pupa, con una proliferación celular aproximada de 8.5 h por ciclo de división. Las alas de *D. melanogaster* están constituidas por dos monocapas celulares (dorsal y ventral) con un plano de división celular orientado perpendicularmente al eje del ala, de manera que los eventos que regulan a las células de una capa son independientes de la otra. Al diferenciarse, cada célula acumula de fibras de actina en un polo formando un tricoma y al morir la célula solo es observable la presencia de estos en la superficie del ala (García Bellido y Merriam, 1971).

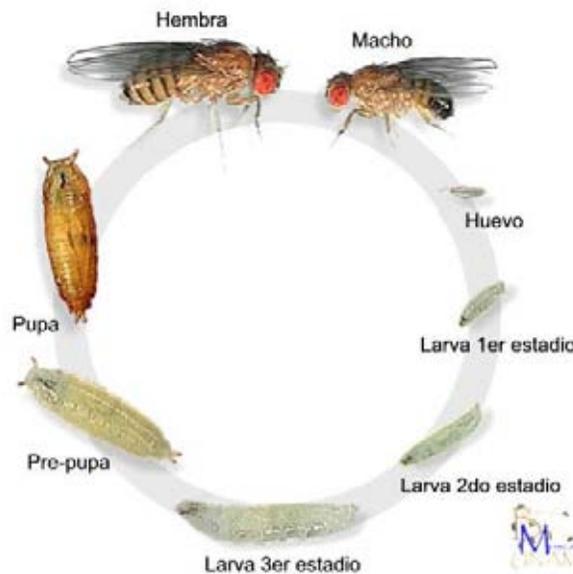


Imagen Ciclo de vida: Banco de Moscas, Facultad de Ciencias, UNAM

Fig. 1 Ciclo de Vida de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

Uso como modelo biológico

La mosca de la fruta es un excelente organismo modelo, es un eucarionte con dimorfismo sexual claro en el adulto, de progenie numerosa y con un ciclo de vida corto que permite un rápido análisis de una gran cantidad de progenie y distinguir entre tratamientos crónicos, agudos y fraccionados (Mitchell y Combes, 1984). Además, pueden aislarse fácilmente grandes números de organismos vírgenes para realizar cruza con arreglos genéticos particulares.

Su genoma se encuentra totalmente mapeado y secuenciado y contiene 13,601 genes en 180 Mb, de las cuales sólo 120Mb es eucromatina comprendida en un cromosoma sexual, dos autosomas largos y un pequeño autosoma que contiene sólo alrededor de 1Mb de eucromatina (Adams *et al.*, 2000). Esta mosca presenta sistemas enzimáticos dependientes del citocromo P-450 y del sistema de citocromo oxidasa, similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hällstrom *et al.*, 1982) que permiten la bioactivación de promutágenos. Su mantenimiento es de costo relativamente bajo y requiere poco espacio. Actualmente se dispone de numerosos arreglos genéticos y cromosómicos en diversos bancos de moscas alrededor del mundo.

Por sus características, la mosca de la fruta es utilizada en diferentes áreas de estudio en diversas metodologías *in vitro* e *in vivo* para evaluar parámetros bioquímicos y eventos genéticos terminales como la letalidad, citotoxicidad, teratogénesis, daño reprotóxico, mutación y recombinación en células germinales y somáticas, entre otros. La letalidad evalúa el daño que un compuesto causa a los sistemas biológicos mediante la sobrevivencia de los organismos. La mutación somática y recombinación mitótica son indicadores de la capacidad

de un compuesto para alterar la calidad del material genético. En este insecto, pueden evaluarse la mutación, recombinación, delección y no disyunción ocurridos durante la mitosis de las células somáticas de los discos imagales mediante la frecuencia de grupos de manchas mutantes de células que expresan marcadores genéticos en el adulto en la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART). La teratogénesis es el reflejo del daño en células somáticas imagales en desarrollo y es evaluada mediante la proporción de órganos malformados en moscas expuestas a un genotóxico. La fertilidad de un organismo es una medida de la capacidad de reproducción y por tanto es un indicador del daño reprotóxico generado por un genotóxico en las células germinales y/o en el tejido somático de los órganos relacionados con la reproducción.

Actualmente, es común el uso de metodologías que involucran cultivos celulares de *D. melanogaster* en diferentes áreas de investigación científica. El manejo de estas líneas celulares es más sencillo que el de mamíferos pues crecen a temperatura ambiente y no requieren CO₂ disuelto en la fase gaseosa, aunque son extremadamente susceptibles a contaminación por levaduras. La línea 2 de Schneider (S2S, S2, SL2, Schneider2) (Schneider, 1972) originaria de cultivos primarios preparados de embriones tardíos disgregados es una de las líneas más frecuentemente utilizada. Ésta presenta una expresión genética similar a la de hemocitos premetamórficos larvarios y a la de células hematopoyéticas de glándulas linfáticas (Andres y Cherbas, 1992 y 1994). El uso de estos cultivos permite la evaluación de variables de respuesta a nivel celular, como variables bioquímicas y la citotoxicidad que evalúa el daño a los sistemas celulares mediante la sobrevivencia de las células en cultivo.

Talidomida

La talidomida, es quizás el teratógeno humano mejor conocido. Fue sintetizada por la farmacéutica alemana Grünenthal como un sedante para las mujeres embarazadas en 1954, sin embargo, fue retirada del mercado en 1961 debido a su asociación con la focomelia (acortamiento de huesos largos de brazos y piernas) cuando era ingerida en las tres primeras semanas del embarazo. Se estima que más de 20,000 niños alrededor del mundo fueron afectados (AVITE). Actualmente pese a que aún no se conoce su mecanismo de acción, este medicamento es utilizado en diversos países incluyendo a México para el tratamiento de numerosas patologías como lupus, artritis reumatoide, VIH y diversos tipos de cáncer (Moos *et al.*, 2003). Su uso en países en desarrollo con sistemas de salud poco eficientes y pobre supervisión en la prescripción de medicamentos ha generado de nuevo un aumento en el número de nacimientos con focomelia (Moos *et al.*, 2003). Tan sólo en Brasil durante 2004 se presentaron 120 casos de infantes con focomelia asociada con el consumo de talidomida (Ugalde y Homedes, 2007).



Fig. 2. Estructura Molecular de Talidomida

Características fisicoquímicas

La talidomida (**Fig. 2**) (CAS 50-35-1) es un sólido blanco de 258.23 g/mol de peso molecular, de baja solubilidad en agua (50-200 µg/ml (193-774 µM) a 22°C y pH=7) y etanol, y un punto de ebullición entre 269 y 271°C. Su molécula consiste en una estructura lipofílica susceptible a hidrólisis, compuesta por dos anillos con un carbón asimétrico en el anillo glutaramido. Este fármaco es una mezcla racémica de enantiómeros S(-) y R(+) con actividades diferenciales que bajo condiciones fisiológicas son rápidamente interconvertidos (Patil y Bhise, 2003). Su hidrólisis ocurre de manera espontánea no enzimática y se han estimado más de 100 metabolitos de la hidrólisis de la talidomida (Xinuy *et al.*, 1999) que pueden ser encontrados en el plasma y podrían interferir con la expresión y regulación genética.

Farmacocinética

Debido a su baja solubilidad en agua, su biodisponibilidad real es desconocida, sin embargo, en el ser humano es dependiente de la ingesta paralela de alimentos y de la dosis. La concentración sanguínea máxima en humanos se alcanza después de 4 h de una ingesta oral de 100 mg y es cercana a 1 µg/ml (3.8 µM). La biodisponibilidad media por aplicación oral es 40% mayor a la de aplicación rectal. Su excreción es por vía renal, 40% del fármaco administrado oralmente es excretado como productos de hidrólisis y sólo el 1% es excretado sin metabolizar. Su vida media ($T_{1/2}$) varía entre 3.0 y 14.6 h, aunque se ha reportado una $T_{1/2}$ significativamente mayor en pacientes con tratamientos crónicos para cáncer de próstata. Este medicamento puede ser metabolizado por CYP450 3A1 (Braun *et al.*, 1986) y por la Prostaglandina H2 Sintetasa (PH2S) (Winn *et al.*, 1997; Patil y Bhise, 2003). Se desconoce su unión a proteínas plasmáticas, sin embargo, puede interactuar con ácidos nucleicos como análogo de guanina (Huang y McBride, 1990) y el anillo glutaramido puede unirse a DNA desnudo de embriones de ratas (Huang y McBride, 1997).

Mecanismo de acción de la talidomida

Diversos efectos han sido propuestos como el mecanismo de acción, sin embargo, tanto este como las alteraciones metabólicas y/o genéticas, en células somáticas y/o germinales que pueda generar aún no se conocen.

Los efectos inmunomodulatorios de este fármaco han sido muy discutidos e incluyen la disminución de la relación CD4/CD8, y un cambio de una respuesta inmune altamente citotóxica dominada por células T y disparada por Interferon- γ a una respuesta inmune mediada por anticuerpos e inducida por interleucina-4 (Moos *et al.*, 2003).

La talidomida también altera la membrana celular al inhibir la endocitosis en células polimorfonucleares (Ávalos-Díaz *et al.*, 1985) y la quimiotaxis en neutrófilos, además, disminuye la densidad de moléculas de adhesión celular ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina inducidas con TNF- α en la superficie de células endoteliales de la vena umbilical humana (Teo, 2005) y la presencia de algunos receptores de integrinas y receptores membranales en leucocitos incluyendo al receptor CD44.

El efecto más conocido del fármaco es la inhibición de la producción de TNF- α probablemente por la degradación acelerada de su RNAm, por la unión a la Glicoproteína Ácida α 1 que presenta actividad anti-TNF- α o al suprimir la activación de NF- κ B (Sekhar *et al.*, 2002), factor crítico de transcripción involucrado en respuesta inmune y crecimiento celular capaz de traslocarse al núcleo y regular diversos genes incluyendo TNF- α . Además, inhibe la producción de IL-6 e IL-12 en monocitos, probablemente también por el bloqueo de NF- κ B. En 1994 D'amato y cols. descubrieron actividad antiangiogénica en un modelo de

angiogénesis inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y por el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Sahuer *et al.* (2000) han asociado este efecto a la generación de radicales hidroxilo (Sahuer *et al.*, 2000). Diversos autores consideran que el estrés oxidante juega un papel importante en la actividad de la talidomida pues su hidrólisis espontánea produce radicales hidroxilo que causan daño oxidante en macromoléculas (Wells, 1997; Hansen *et al.*, 1999; Parman, 1999; Sauer *et al.*, 2000; Jason *et al.*, 2002) y es capaz de iniciar la oxidación de DNA en tejidos embrionarios (Winn *et al.*, 1997).

Letalidad

Gordon (1981) ha reportado la letalidad de este medicamento en linfocitos humanos, sin embargo, no se han reportado evidencias de letalidad en humano ni en *Drosophila melanogaster* por este medicamento. La LD50 oral de talidomida en rata es 113 mg/kg mientras que la dérmica es 1,550 mg/kg. En ratón, la LD50 oral es 2000 mg/kg, mientras que la dosis letal más baja publicada por aplicación intraperitoneal es 800 mg/kg (Calbiochem, 2003).

Mutagénesis

Los efectos mutagénicos de la talidomida han sido muy discutidos. Diversos estudios han mostrado: un mayor número de aberraciones cromosómicas y aneuploidias en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a talidomida (Benda *et al.*, 1963) y en linfocitos en cultivo tratados con 1 µg/mL (Jensen, 1965) y 1-50 µg/mL (Roux *et al.*, 1971), así como un mayor número de aberraciones cromosómicas en médula ósea en conejos tratados con 150 mg/kg/d (Roux *et al.*, 1971); su mutagenicidad en *Salmonella* y médula ósea de ratón (Mackenzie, 1983); la alteración *in vivo* en la estructura secundaria del DNA de embriones de ratas y la unión del anillo glutaramido al DNA de embriones de ratas (Huang y McBride, 1990

y 1997); y la presencia en hijos de padres focomélicos por talidomida de malformaciones similares sugiriendo un efecto transgeneracional (McBride, 1994).

En 1997, un equipo de 14 investigadores de los laboratorios de toxicología e investigación Zeneca y Merck comandados por Ashby (1997) mostró la falta de mutagenicidad de talidomida en un estudio que incluyó 32 bioensayos en diferentes phyla (incluida *D. melanogaster*) utilizando concentraciones (625-5000 μM) lejanas a las dosis ingeridas por los pacientes y superiores a la solubilidad máxima en agua (774 μM). Además, en los bioensayos de mutagenesis en *Salmonella*, el estudio presenta valores de mutación en testigos con desviaciones estándar de la mitad del valor de la media (13.16 ± 6.7 , 9.8 ± 4.5) y experimentales mayores al de la media (34.3 ± 38.7 , 39.3 ± 49.1) que no permitirían discriminar un efecto de los tratamientos. De manera similar, en el bioensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón, el estudio muestra valores en testigos con desviaciones estándar mayores al valor de la media (1.4 ± 1.5) y experimentales con desviaciones de más de dos veces la media (1 ± 2.24). Un estudio independiente de la farmacéutica Celgene (Teo, 2000), también concluyó que talidomida no es mutagénica en *Salmonella* probando concentraciones de hasta 10,000 $\mu\text{g}/2\text{mL}$ (19,362 μM) a pesar de que la respuesta en algunos tratamientos con concentraciones menores es significativamente positiva (1670 $\mu\text{g}/2\text{ mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En estudios realizados en *D. melanogaster* con la Prueba SMART en alas (Ramos-Morales *et al.*, 2002 y 2005) se ha mostrado la mutagenicidad de este fármaco al incrementar 19 veces la frecuencia del testigo en tratamientos subcrónicos (48 h) e inducir rompimientos de DNA reparados por recombinación en concentraciones bajas (0.15 μM) pero no en concentraciones altas (625 μM), concordando con la falta de respuesta en concentraciones altas reportada por Ashby (1997).

Teratogénesis

Los efectos teratogénicos son especie específicos: humanos, conejos (dosis de 100-300 mg/kg/d) (D'amato *et al.*, 1994), macacos y pollos presentan malformaciones (Kemper, 1962), mientras que en ratas, ratones, gatos y hámsteres no hay efectos (Patil y Bhise, 2003). En humano, la focomelia es inducida cuando la ingestión del fármaco ocurre durante el periodo de organogénesis embrionaria, entre los días 20 y 36 después de la fertilización (Miller y Strömmland, 1999), sin embargo, no se ha encontrado relación entre la severidad de la malformación y la dosis ingerida. La talidomida produce malformaciones predominantemente en brazos, piernas (Smithells *et al.*, 1992), corazón, riñones y tractos urinario, digestivo y genital, sin embargo, prácticamente cualquier órgano puede ser afectado (Taussig, 1962). La mortalidad temprana de bebés afectados es alrededor de 40% y se debe principalmente a malformaciones internas severas, sin embargo, puede ser subestimada por los abortos tempranos inducidos. Estudios en *D. melanogaster* muestran que talidomida induce malformaciones en placa genital concentración-dependiente, y en cabeza sólo en algunas concentraciones, mientras otras regiones evaluadas (tórax y abdomen) no mostraron inducción significativa de malformaciones (Ramos-Morales *et al.*, 2005).

Reprotoxicidad

Estudios en pollos (Lai y Palmieri, 1970) y conejos (Teo *et al.*, 2004) no muestran alteraciones de su fertilidad, sin embargo, estos involucran organismos adultos con gónadas formadas donde las primeras etapas meióticas de las células germinales ya ocurrieron. No se han reportado estudios en organismos con células gonadales indiferenciadas al momento del tratamiento. En estudios realizados en *D. melanogaster* se ha demostrado que este fármaco es capaz de inducir cambios en la fertilidad dependiendo del sexo del progenitor tratado con bajas concentraciones (0.156 μ M) (Herrera- Bazán, 2005).

Estrés oxidante

La naturaleza fisicoquímica de un compuesto, su bioactivación y metabolismo, pueden generar ROS. El radical OH^\bullet es una de las ROS más dañinas por su alta reactividad pues tiene una vida media corta y no puede difundir más que la distancia de una o dos de sus moléculas debido a que se reduce rápidamente ($10^9/\text{M s}$) al oxidar cualquier compuesto o biomolécula cercana (Marnett, 2000), incluyendo DNA si es generado inmediata y adyacentemente a él. Alrededor del 20% de los OH^\bullet que reaccionan con el DNA lo hacen oxidando la desoxirribosa, también puede atacar el doble enlace $\text{C}_5=\text{C}_6$ de la pirimidina (Ward, 1998), o los fosfatos si bien la reacción es más lenta (Breen *et al.*, 1995). Dependiendo de su distribución, los radicales OH^\bullet pueden generar muchos sitios de daño al DNA en el área de unos pocos pares de bases en una o ambas cadenas, generando rompimientos de una hebra (SSB) o de dos hebras (DSB) (Friedberg *et al.*, 2006; Hansberg, 2002). La radiación ionizante genera radicales hidroxilo y produce más DSB que SSB, debido a las altas concentraciones locales de OH^\bullet que se generan por la colisión con átomos de DNA. En cambio, compuestos químicos como el H_2O_2 , que difunden y producen OH^\bullet homogéneamente en el interior celular, producen en su mayoría SSB y cantidades no significativas de DSB. El potencial genotóxico de las ROS es bien conocido (Williams y Jeffrey, 2000) y Wells (1997) las ha relacionado también con embriotoxicidad. Muchas vías críticas de transducción de señales del desarrollo embrionario, apoptosis, proliferación y diferenciación celular son sensibles al estado redox celular (Hansen, 2006). El potencial teratógeno de algunos compuestos depende del estrés oxidante generado por la desregulación de vías metabólicas controladas por dúplex de tioles redox celulares, como glutatión/glutatión disulfuro y cistina/cisteína. En los seres vivos, el equilibrio de estos dúplex

redox es mantenido por sistemas antioxidantes (enzimas, vitaminas o biomoléculas como glutatión) que protegen a los sistemas biológicos de los efectos dañinos de la oxidación excesiva (Krinsky, 1992) al controlar, atrapar, o suprimir la formación de ROS o revertir las reacciones que genera (Sikka, 1996). Muchos de ellos son donadores de electrones y reducen los radicales libres a productos inocuos como el agua. La primera línea de defensa antioxidante celular son agentes de bajo peso molecular como glutatión, α -tocoferol, bilirrubina ó ácido úrico, que remueven catalíticamente radicales libres y eliminan especies ya formadas antes de que dañen a otras biomoléculas (Halliwell y Gutteridge, 1995).

Glutatión

El glutatión es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) con un enlace γ -glutamil y un grupo tiol libre (SH) que lo hace extremadamente reactivo. Esta molécula es el tiol de peso molecular más bajo y más común, celular y filogenéticamente, de respuesta inmediata en el mantenimiento del estado redox. Este puede existir tanto en su forma reducida (GSH) como oxidada o glutatión disulfuro (GSSG) y el duplex 2GSH/GSSG es conocido junto con las enzimas relacionadas con su reciclaje y mantenimiento como Sistema Glutatión. El nivel intracelular de glutatión en células de mamífero se halla entre 0.5-10 mM, del cual más del 99% se encuentra como GSH.

El ciclo de síntesis y degradación de glutatión es conocido como ciclo γ -glutamil. El GSH es sintetizado intracelularmente por la acción consecutiva de la enzima γ -glutamil-cisteinil sintetasa (GCS: GSH1: Ligasa Glutamato-Cisteína, GCL) que une el L-glutamato y la L-cisteína gastando ATP en una reacción con retroalimentación negativa, y la enzima glutatión sintetasa (GSH2) que une L-glicina al producto de la GSH1 gastando ATP. La GSH2 es un dímero de subunidades idénticas de 118kD cada una. Los sitios activos que unen L-glicina y

el residuo cisteína de L- γ -glutamil-L-cisteína son altamente específicos, sin embargo, la GSH2 puede actuar sobre dipéptidos donde el residuo L- γ -glutamil es reemplazado por D- γ -glutamil, β -aminoglutaril, monometil (α -metil, β -metil, γ -metil, N-metil) glutamil, glutaril, o N-acetil (Meister *et al.*, 1983). El gen de GSH2 está reportado en FlyBase como FBgn0030882 con diferentes sinónimos CG32497, CG33065, CG6835, Fbgn0052497 y Fbgn0053065. Este gen se localiza en el cromosoma X de *D. melanogaster* en 16F1 del nucleótido 17783580 al 17792488 comprendiendo 8909 nucleótidos en 8 exones y 7 intrones. Su región 5'UTR comprende 165 nucleótidos y 3'UTR 146. No tiene alelos reportados y tiene 3 transcritos anotados de 695, 1821 y 1970 nucleótidos aunque sólo 2 traducciones anotadas de 127 y 551 aminoácidos debido a que la diferencia entre el transcrito de 1821 y el de 1970 es en la región 5'UTR.

El GSH puede ser oxidado por diversos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos como la radiación ionizante ó el metabolismo de xenobióticos al generar ROS. Comúnmente, el nivel intracelular de GSSG es extremadamente bajo, sin embargo, en condiciones de estrés oxidante puede aumentar sustancialmente modificando el estado redox y el Potencial de Reducción (E_{hc}) del dúplex 2GSH/GSSG. Los cambios en E_{hc} están fuertemente asociados con el estado de los reguladores de funciones biológicas importantes para la célula y es así como un cambio en el estado redox celular puede producir consecuencias en algunos parámetros biológicos (**Fig.3**) (Freya *et al.*, 2001).

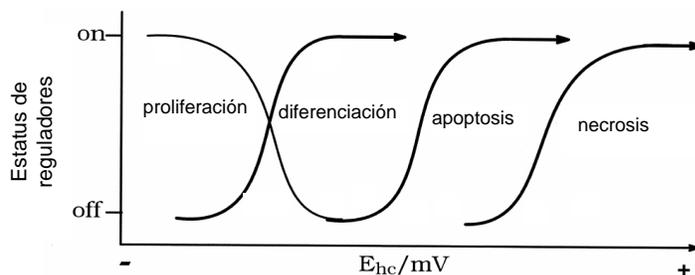


Fig. 3. Relación entre los reguladores del estado celular y el potencial de reducción E_{hc} de la pareja GSSG/2GSH. Traducido de Freya *et al.*, 2001

La GSH-Px dependiente de selenio cataliza la reducción de H_2O_2 y otros peróxidos a agua oxidando GSH, sin embargo, algunas GST pueden también catalizar esta reacción. En *D. melanogaster* se han identificado dos genes putativos de GSH-Px no dependientes de selenio por medio de análisis genómicos *in silico*, sin embargo, Missirlis y colaboradores (2003) determinaron que estas enzimas no tienen función de GSH-Px sino de TrxPx.

En eucariontes superiores, la GR es la principal enzima encargada de reducir GSSG a GSH usando NADPH aunque también participa la TrxR. Se ha mostrado que en *D. melanogaster* la principal vía para reciclar GSSG es la TrxR, pues carece de GR (Kanzok *et al.*, 2001). TrxR es capaz de reducir otros sustratos además de Trx gracias a un residuo de seleniocisteína altamente reactivo. Sin embargo debido a esta alta capacidad reductora, TrxR puede ser inhibida por diversos compuestos electrofílicos como nitrosoureas, aurotioglucosa, compuestos de platino y derivados del ácido retinóico (Nordberg *et al.*, 2001).

Justificación

Desde su asociación con la inducción de teratogénesis humana, la talidomida ha sido descrita como mutágeno y reprotóxico para algunos organismos en diferentes estudios pero su mecanismo de acción no es claro.

En 1997, un equipo multidisciplinario comandado por Ashby de las farmacéuticas Merck y Zeneca publicó un estudio con 32 bioensayos en diferentes phyla que rechazó la mutagenicidad de la talidomida, sin embargo, todos los sistemas de prueba utilizados involucraron células somáticas, ninguno es transgeneracional y las concentraciones utilizadas son muy superiores a las dosis ingeridas por pacientes y a las concentraciones sanguíneas máximas encontradas en humanos.

El uso de talidomida dentro de los cuadros de medicamentos para tratamiento de diversos tipos de enfermedades en diferentes países, hace necesaria la evaluación de la genotoxicidad y el descubrimiento del mecanismo de acción de la talidomida.

La talidomida ha presentado actividad genotóxica en concentraciones bajas en *Drosophila melanogaster* y diversos autores han propuesto al estrés oxidante como una de las principales vías de acción, sin embargo, no existen estudios que relacionen el estado redox celular con la actividad genotóxica *in vivo*.

Objetivo General

Estudiar la relación entre la letalidad, teratogénesis, reprotoxicidad y mutagenicidad en moscas *Drosophila melanogaster* expuestas a talidomida y el estado redox celular *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos Particulares

- 1.- Determinar la letalidad, teratogénesis, fertilidad, inducción de mutaciones y recombinación somática, cambios en la cantidad de proteína total, GSH y GSSG *in vivo*, en moscas *D. melanogaster* tratadas con una concentración baja (0.156 μM) y una alta (156 μM) de talidomida durante 30 y 180 min.
- 2.- Determinar cambios en la viabilidad celular, cantidad de proteína total, GSH, GSSG, la fosforilación de H2A.x y el RNAm de GSH2 *in vitro*, en células S2S de *D. melanogaster* tratadas con una concentración baja (0.156 μM) y una alta (156 μM) de talidomida durante 30 y 180 min.
- 3.- Determinar la relación entre el cambio en las diferentes variables de respuesta biológicas con cambios en el estado redox celular *in vivo* e *in vitro*.

HIPÓTESIS

La inducción de letalidad, teratogénesis, reprotoxicidad y mutagenicidad en las moscas expuestas a concentraciones bajas pero no en moscas expuestas a concentraciones altas de talidomida, está relacionada con los cambios en el estado redox celular producido por el estrés oxidante derivado de la hidrólisis de la talidomida.

METODOLOGÍA

Con el fin de investigar el papel del estrés oxidante como mecanismo de acción de la talidomida, se estudió el cambio en 13 variables tanto de parámetros biológicos *in vivo* como *in vitro*, exponiendo a larvas y células en cultivo. La composición de las soluciones utilizadas en las diferentes metodologías se describen en el **Anexo I** y las metodologías *in extenso* en el **Anexo II**.

Concentraciones y tiempos de tratamiento

Se utilizaron las mismas concentraciones y tiempos de tratamiento tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. La determinación de la concentración mas baja se basó en estudios previos *in vivo* en los que la concentración de 0.156 μM presentó los mayores efectos genotóxicos (Ramos-Morales *et al.*, 2005). A partir de esta concentración se seleccionó una concentración tres órdenes de magnitud mayor (156 μM) que en los mismos estudios no presentó efectos genotóxicos. El tiempo de tratamiento fue determinado por medio de dos curvas de tiempo preliminares realizadas con la concentración mas baja evaluando la sobrevivencia de las moscas e involucrando a 1282 y 856 organismos, respectivamente. Los tiempos seleccionados fueron 30 y 180 minutos. En todos los casos, los análisis estadísticos se realizaron con una confianza del 95%.

Experimentos *in vivo*

Se utilizaron tres cepas de *D. melanogaster*: cepa silvestre C-S y las cepas progenitoras en la prueba SMART para evaluar la mutación somática y recombinación mitótica: ♀ *flr³/In* (*3LR*)*TM3, ri p^p sep bx³⁴⁶ e^S Bd^S* y ♂ *mwh,e/mwh,e* (Lindsley y Grell, 1972). En la cepa silvestre C-S se evaluó en estado adulto la letalidad, teratogénesis y fertilidad, y en estado larvario la cantidad de proteína, GSH y GSSG; mientras que en los organismos resultantes de la cruce de la prueba SMART se evaluó en estado adulto la letalidad y la mutación y recombinación somática (Fig. 4).

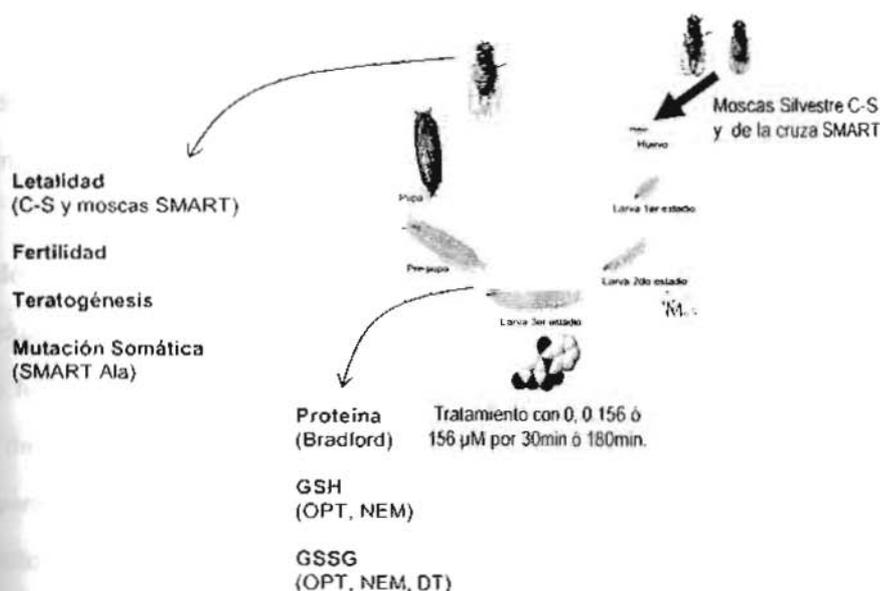


Fig. 4. Variables evaluadas en los experimentos *in vivo*.

Letalidad

La letalidad medida como índice de sobrevivencia, permite la evaluación del daño a los sistemas biológicos de un organismo de manera general y fue evaluada en función del número de organismos adultos sobrevivientes al tratamiento durante su estadio larvario. Las moscas emergidas de las pupas formadas por larvas expuestas a talidomida fueron colectadas y contabilizadas para calcular el índice de sobrevivencia de moscas sobrevivientes respecto al testigo. El testigo representa el 100% de sobrevivencia, por lo que un ISX, igual a 1 en un lote experimental significa que en él sobrevivieron el mismo número de organismos que en el testigo (Arellano, 2002).

$$\text{Índice de Sobrevivencia [ISX]} = \frac{\text{Hembras [X]} + \text{Machos [X]}}{\text{Hembras [X0]} + \text{Machos [X0]}}$$

Para determinar diferencias significativas se utilizó el ANOVA de una vía, y prueba tukey para grupos homogéneos cuando el ANOVA mostró diferencias significativas.

Mutación y recombinación somática

La evaluación del daño genotóxico que el fármaco tiene sobre el DNA en células somáticas *in vivo* fue evaluada por medio de la frecuencia de mutación y recombinación somática a través de la prueba SMART en ala. La prueba SMART utiliza como genes marcadores a *mwh* y *flr³* para evaluar la recombinación, mutación, deleción, y no disyunción ocurridas durante el desarrollo larvario en el brazo izquierdo del cromosoma 3 metacéntrico de las células somáticas de los discos imagales de las alas. La estimación de los eventos genéticos terminales se hace a través de la frecuencia de grupos de tricomas (manchas) en las alas de las moscas que expresan uno (manchas simples) o ambos (manchas gemelas) marcadores genéticos: *mwh* que produce tricomas múltiples por célula, o *flr³* que produce tricomas

ensanchados en su base con forma de flama (Graf *et al.*, 1984). La frecuencia de estas manchas es sólo una fracción de los eventos genéticos totales ocurridos en las moscas tratadas por el compuesto. Las frecuencias de manchas registradas se analizaron en el programa de cómputo SMART basado en la prueba no paramétrica χ_i^2 (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würigler, 1988; Frei y Würigler, 1995) que arroja resultado positivos, débiles positivos, indeterminados o negativos, dependiendo del número de múltiplos (m) que la frecuencia de los tratamientos es la del testigo. En el caso de manchas simples chicas (≤ 2 céls) una diferencia significativa se obtiene cuando $m=2$, mientras que en manchas grandes (>3 céls) o gemelas se necesita $m=5$. Las distribuciones del tamaño de manchas (células por mancha) y del número de manchas por mosca que permite identificar organismos especialmente sensibles a daño genético e identificar respuestas falsas positivas (Ramos-Morales *et al.*, 2002) fueron calculadas y analizadas utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la Prueba de Dunn's para identificar diferencias estadísticamente significativas entre las medianas.

Teratogénesis

La teratogénesis permite la evaluación del daño que un compuesto ocasiona sobre la señalización o DNA en células somáticas en diferenciación y fue evaluada en función del número de moscas silvestres C-S con malformaciones en alguno de sus órganos. Las moscas adultas procedentes de las larvas expuestas a talidomida fueron recolectadas revisando su morfología exterior con el fin de calcular la proporción de moscas con malformaciones respecto al total de moscas de ese tratamiento. Por lo que una proporción de malformaciones con valor de 1 es un tratamiento en el que todas las moscas presentan malformaciones.

$$\text{Proporción de Malformaciones} = \frac{\text{Moscas con Malformaciones en el tratamiento } X_i}{\text{Moscas Totales en el tratamiento } X_i}$$

Para determinar diferencias significativas se utilizó el ANOVA de una vía, y la prueba tukey para grupos homogéneos, cuando el ANOVA mostró diferencias significativas.

Fertilidad

La fertilidad permite la estimación del daño ocasionado por un compuesto en células germinales y somáticas y fue evaluada en función del número de moscas que procrearon moscas silvestres *Canton-S* tratadas durante su estadio larvario. Para ello, las moscas emergidas de los tratamientos fueron cruzadas entre ellas y su progenie fue recuperada y contabilizada, calculando un índice de fertilidad (IF) que refleja el número de moscas producidas por mosca (P) hembra tratada. El índice de fertilidad (IF) de cada tratamiento (IFX_i) fue corregido (IFC) al Índice de Fertilidad del testigo (IFX₀), tal que un IFCX_i igual a 1 significa que en ese tratamiento las moscas tuvieron el mismo número de hijos que en el testigo.

$$\text{Índice de Fertilidad (IFC)} = \frac{(\text{Hembras F1 } X_i + \text{Machos F1 } X_i) / \text{Hembras P } X_i}{(\text{Hembras F1 } X_0 + \text{Machos F1 } X_0) / \text{Hembras P } X_0}$$

Para determinar diferencias significativas se utilizó el ANOVA de una vía, y la prueba tukey para grupos homogéneos cuando el ANOVA presentó diferencias significativas.

Contenido de proteína total

La cuantificación de proteínas totales es un indicador de las alteraciones metabólicas ocasionadas por un compuesto y además permite verificar cambios específicos de determinados péptidos. La cuantificación de proteína total se realizó en larvas expuestas al fármaco midiéndola en los homogenados según el método de Bradford (Bradford, 1976).

Este método utiliza azul brillante de Coomassie G-250 que absorbe en 479nm λ y al unirse a residuos de aminoácidos hidrofóbicos y electrostáticos expuestos en la superficie de las proteínas absorbe en 595 nm λ . Los resultados de la cuantificación de Proteínas fueron expresados como el contenido de proteína (μg) de 15 larvas.

Contenido de GSH

Los cambios en la cantidad de GSH permiten evaluar el estrés oxidante generado por un compuesto. El contenido de glutatión reducido fue determinado en larvas expuestas al fármaco por espectrofotometría usando OPT y NEM como lo describe Senft *et al.* (2000). Este método se basa en la reacción del OPT con grupos amino y sulfhidrilo del GSH y de otros grupos tioles de bajo peso molecular originando un producto cíclico altamente fluorescente OPT-SH que absorbe en 365 nm y emite a 430 nm. Paralelamente, la fluorescencia de muestras con NEM es determinada pues este previene la formación del producto OPT-GSH, de tal manera que la fluorescencia inespecífica por la unión de OPT a otros tioles puede cuantificarse y la diferencia en ambas fluorescencias estima la resultante por el producto OPT-GSH. La cantidad de GSH fue expresada como el contenido de GSH (μg) de 15 larvas.

Contenido de GSSG

Los cambios en la cantidad de GSSG permiten evaluar el estrés oxidante generado por un compuesto. El contenido de glutatión oxidado fue determinado en larvas expuestas al fármaco por espectrofotometría usando OPT, NEM y DT según el método descrito por Senft *et al.* (2000). El DT es un potente agente reductor capaz de reducir GSSG a GSH. En este método, primero el GSH es bloqueado con NEM y entonces el GSSG es reducido a GSH

usando DT. El GSH formado es medido usando OPT. La cantidad de GSSG fue estimada en larvas enteras y los resultados fueron expresados como el contenido de GSSG (μg) de 15 larvas.

Experimentos *in vitro*

Los experimentos *in vitro* se realizaron con cultivos celulares de la línea S2S obtenidos a partir de alícuotas congeladas. Los cultivos se mantuvieron en condiciones asépticas a temperatura ambiente en oscuridad y todo el material utilizado fue de plástico estéril desechable. En los cultivos celulares se evaluó la citotoxicidad y se cuantificó proteína total, GSH, GSSG, la fosforilación de H2A.x y RNAm del gen GSH2 (**Fig. 5**).

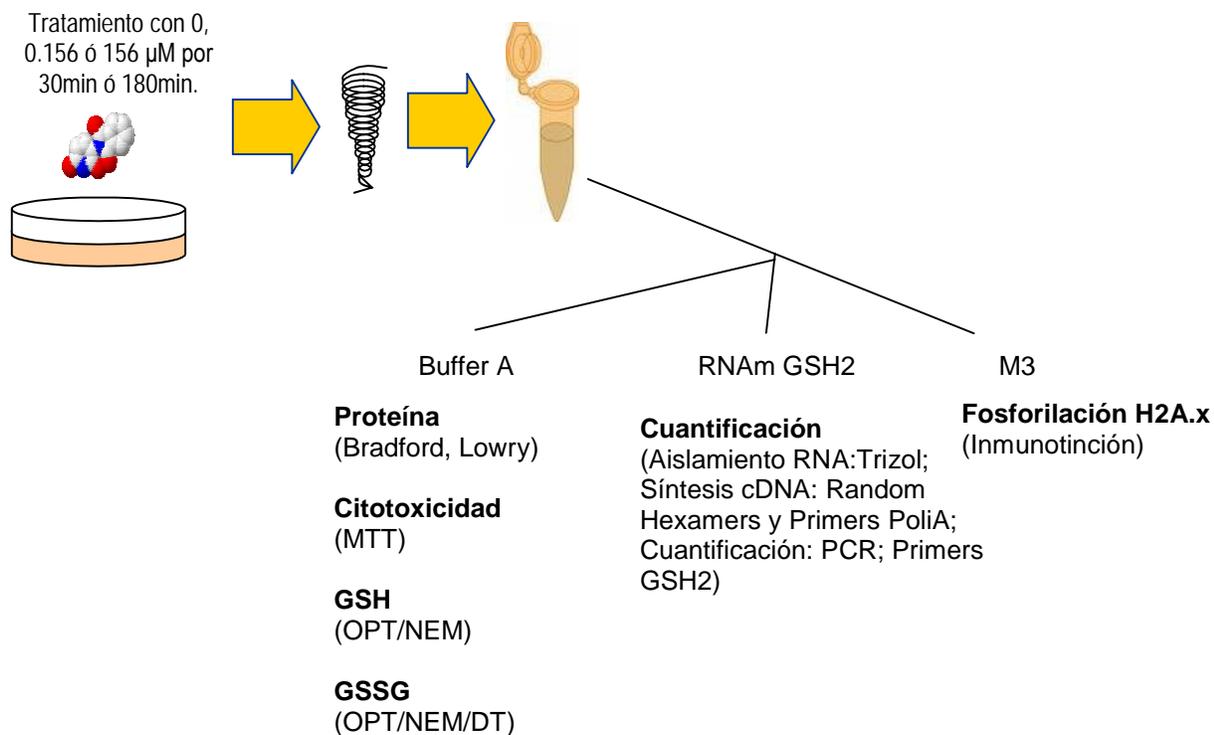


Fig. 5. Variables evaluadas en los experimentos *in vitro*.

Citotoxicidad

La citotoxicidad permite la evaluación del daño a los sistemas biológicos celulares de manera general tal que compromete su sobrevivencia y fue evaluada en función de la viabilidad celular mediante la conversión de sales de tetrazolio (3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT) amarillas y solubles a cristales de formazan púrpuras e insolubles. Esta conversión sólo es posible por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Los resultados fueron reportados como porcentaje del testigo.

Contenido de Proteína Total

El contenido de proteínas fue evaluado de acuerdo al método de Lowry (BioRad). Los resultados se expresan como porcentaje del contenido del testigo.

Cuantificación de GSH

El contenido de GSH fue determinado por espectrofotometría usando OPT y NEM siguiendo el método descrito por Senft *et al.* (2000). Los resultados se expresan como el contenido de GSH en μg .

Contenido de GSSG

La cuantificación de GSSG se realizó siguiendo el método según Senft *et al.* (2000). Los resultados se expresan como el contenido de GSSG en μg .

Fosforilación de H2A.x

La cuantificación de H2A.x fosforilada permite la evaluación de DSB en DNA producidos por un compuesto. H2A.x es una de las variantes mejor caracterizadas de la familia con mayor número de variantes descritas (Ausio y Abbott, 2002). Esta histona es importante para la estabilidad genómica (Bassing *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2002; Bassing *et al.*, 2003; Celeste *et al.*, 2003) y su fosforilación es indispensable para el reconocimiento de DSB y el reclutamiento de los factores de reparación (Madigan *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2003).

En eucariontes inferiores, H2A.x posee un dominio de cola C-terminal no extendido y un motivo SQ localizado dos residuos río arriba del codón de término cuya fosforilación es una de las respuestas más tempranas a DSB inducidos o programados (Rogakou *et al.*, 1998; Mahadevaiah *et al.*, 2001) señalados por ATM, ATR y DNA-PK que inducen la fosforilación (Downs *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2004). Aunque esta histona H2A.x está uniformemente distribuida en la cromatina, su fosforilación sólo ocurre de 1 a 3 min después en la vecindad del daño (Madigan *et al.*, 2002; Friedberg *et al.*, 2006). Algunos estudios han mostrado que esta histona ya se encuentra fosforilada apenas 20 s después de que se origina el DSB, tan sólo 1 min después alcanza la mitad de su nivel máximo que se alcanza a los 9 min, disminuyendo lentamente durante los siguientes 90 min (Rogakou *et al.*, 1998). Además, su vida media de 2 h es similar a la cinética de la reparación de DSB (Redon *et al.*, 2002) y se encuentra ligada a los puntos de chequeo del ciclo celular en S-G2 (Andäng *et al.*, 2008). En *D. melanogaster*, el motivo SQ está presente en el dominio C-terminal de la histona H2A.v, el cual también es fosforilado en respuesta a DSB y reconocido por los anticuerpos anti-SQ de H2A.x (Madigan *et al.*, 2002). H2A.x fosforilada es considerada como un marcador de daño a DNA y la detección de su inmunofluorescencia está incrementando

su importancia como un método específico y sensible para detectar DSB (Rothkamm *et al.*, 2003; Aten *et al.*, 2004; Friedberg *et al.*, 2006; Andreyeva *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2008). En este trabajo, la inmunofluorescencia de H2A.x se expresa como la proporción promedio de células positivas para el anticuerpo.

Cuantificación de RNAm de GSH2

La cuantificación del RNAm de GSH2 es un indicador de la síntesis de GSH y se realizó mediante el aislamiento del RNAm total, su conversión a cDNA y su cuantificación por medio de PCR utilizando primers específicos. Para confirmar que la obtención de cDNA fuera correcta se utilizaron primers para actina de *Drosophila* amplificando por PCR un producto de 100 pb del cDNA obtenido del RNAm aislado. Para confirmar que la PCR fuera correcta se amplificó un producto del gen RPA34 en un plásmido detectado en un gel de agarosa.

Resultados

Curva de tiempo

Un mayor número de organismos respecto al testigo se recuperó en los tratamientos de 30 y 60 min y cerca de un 35% menos en 2 h. Fueron seleccionados como tiempos de tratamiento 30 y 180 min debido a que la sobrevivencia fluctúa alrededor del testigo en tiempos menores a 180 min, y se mantiene similar a él en tiempos mayores a 180 min (**Fig. 6**), además, la variación en la sobrevivencia de los organismos es similar en ambos.

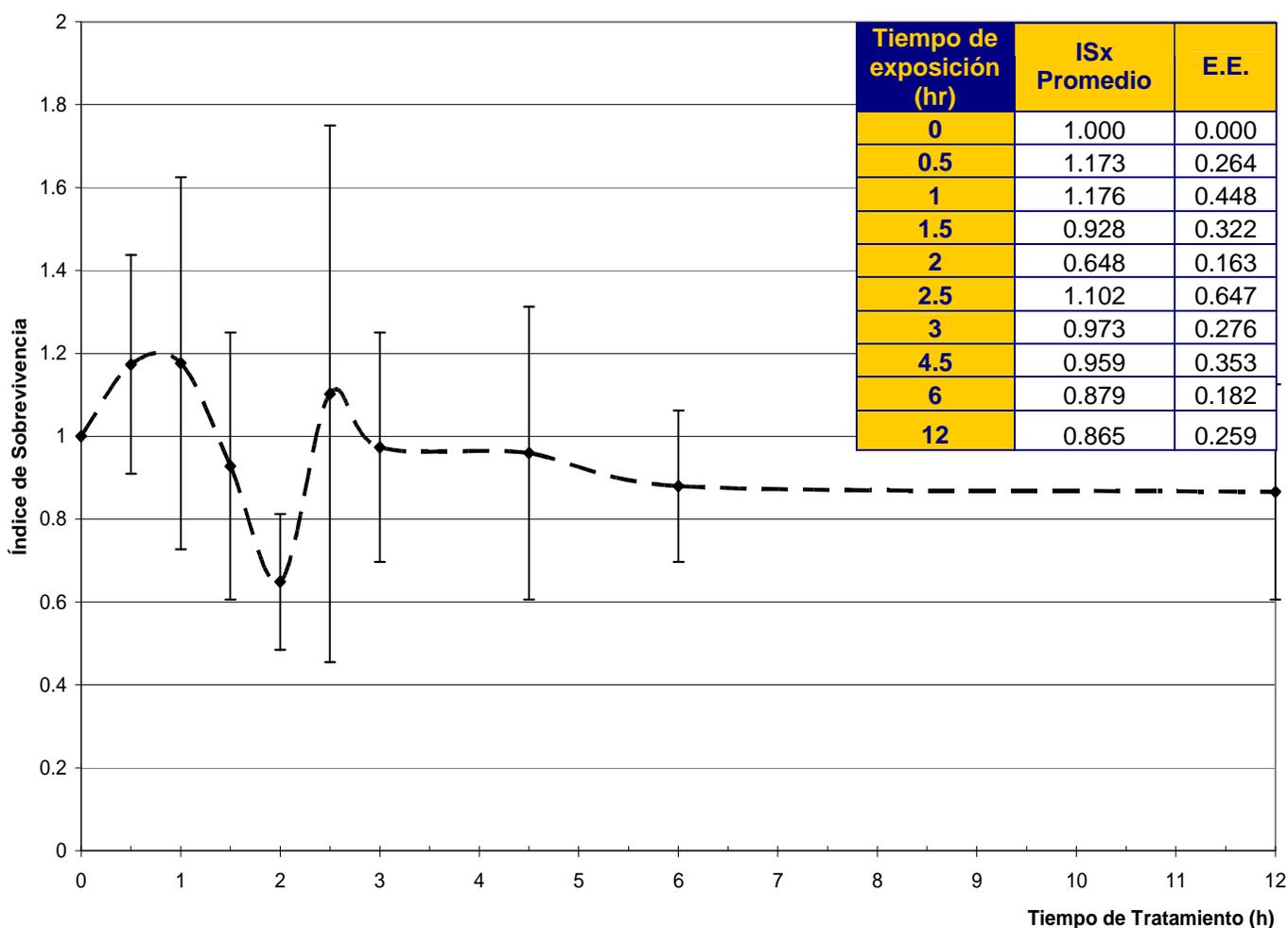


Fig. 6. Curva de sobrevivencia de moscas silvestres *C-S D. melanogaster* con 0.156 μ M de talidomida durante diferentes periodos. Recuadro: Índices de Sobrevivencia

Experimentos *in vivo*

Toxicidad

Se observaron pequeñas diferencias en la sobrevivencia de las moscas silvestres C-S entre los tratamientos y en la proporción de hembras en cada tratamiento (**Tabla I**), sin embargo, ninguna fue estadísticamente significativa (MANOVA, $p > 0.05$).

Tabla I. Índice de Sobrevivencia de moscas silvestres C-S *D. melanogaster* expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario. (n= 3087)

[uM]	Índ. Sobrevivencia				Proporción de Hembras			
	30 min		180 min		30 min		180 min	
	Prom	E.S.	Prom	E.E.	Prom	E.S.	Prom	E.E.
0	1.000	0.000	1.000	0.000	0.517	0.015	0.489	0.018
0.156	0.983	0.128	1.267	0.243	0.493	0.047	0.452	0.026
156	1.054	0.138	1.118	0.033	0.460	0.030	0.466	0.010

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia de la progenie de la cruce de SMART (**Tabla II**), por sexo, tipo de progenie, concentración de talidomida, tiempo de tratamiento, o alguna de las interacciones (MANOVA, $p > 0.05$).

Tabla II. Índice de Sobrevivencia de moscas SMART *D. melanogaster* tratadas con talidomida durante el desarrollo larvario.

[µM]	Portadora TM3				Libre de Inversión TM3				Total			
	30 min		180 min		30 min		180 min		30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000
0.156	1.121	0.059	0.990	0.034	1.147	0.236	1.155	0.104	1.122	0.097	1.084	0.074
156	0.919	0.021	1.092	0.201	1.163	0.178	1.016	0.151	1.040	0.074	1.049	0.172

Mutación somática y recombinación mitótica (SMART Ala)

La frecuencia de mutación en las moscas tratadas con talidomida, no mostró diferencias con el testigo ($\chi^2_{g.l.=5}$, $p > 0.05$), ni una respuesta diferente entre sexos ($\chi^2_{g.l.=1}$, $p > 0.05$) (**Tabla III**), sin embargo, en todos los tratamientos se observa una disminución en la frecuencia de

mutación (Tabla IV, Fig. 7). Al diferenciar la frecuencia en manchas chicas y grandes, la disminución es más importante en machas de más de tres células.

Tabla III. Frecuencia de mutación por sexo en la prueba SMART en moscas *D. melanogaster* libres de inversión expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario.

[μM]	30 min		3 min	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
0	0.311	0.297	0.259	0.273
0.156	0.203	0.250	0.195	0.208
156	0.256	0.192	0.162	0.227

Estas frecuencias menores a la del control no son significativas con los métodos estadísticos utilizados por Frei y Würigler (1988), sin embargo, lo son con una confianza del 99.9% al comparar la proporción experimental con la del testigo al emplear otros métodos estadísticos (Z Test para 2 proporciones, $p < 0.01$). Esto se debe a que los métodos estadísticos utilizados en SMART se basan en el número de múltiplos (m) que la frecuencia experimental es la del testigo y detectan como resultado positivo a aquella frecuencia de manchas chicas que es más de 2 veces la del control o de manchas grandes que es más de 5 veces. Esto hace que cualquier frecuencia menor a la del testigo es igualmente negativa que una mayor pero que no alcanzan a quintuplicar la frecuencia del testigo (Frei and Würigler, 1988).

Tabla IV. Frecuencia de mutación estimada mediante SMART en moscas *D. melanogaster* libres de inversión expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario.

t	[μM]	No. alas revisadas	Manchas Chicas (1-2 céls) m=2			Manchas Grandes (>3 céls.) m=5			Manchas Gemelas m=3			Manchas Totales m=2		
			No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.
30 min	0	148	38	0.257		7	0.047		0	0.000		45	0.304	
	0.156	138	30	0.217	-	1	0.007	-	0	0.000	-	31	0.225	-
	156	160	30	0.188	-	6	0.038	-	0	0.000	-	36	0.225	-
180 min	0	120	22	0.183		10	0.083		0	0.000		32	0.267	
	0.156	154	30	0.195	-	1	0.006	-	0	0.000	-	31	0.201	-
	156	140	22	0.157	-	5	0.036	-	0	0.000	-	27	0.193	-

Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei and Würigler, 1988. No.=Número; Fr.=Frecuencia; D.=Diagnóstico; - =negativo. $\alpha=0.05$. Pruebas Estadísticas de una cola.

La distribución del tamaño de mancha (células por mancha) (**Tabla V**) presentó una proporción de manchas pequeñas mayor en moscas expuestas a 0.156 μM que en el testigo independientemente del tiempo de tratamiento, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Kruskall Wallis, $H=5.3032$, $p=0.380$).

Tabla V. Distribución de la proporción manchas por tamaño (células por mancha) en moscas silvestres *D. melanogaster* libres de inversión expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario.

t	[μM]	Número de céls (edad aprox. de la larva en horas en que se generó)							Total de manchas
		1(72)	2 (80)	3-4 (88)	5-8 (96)	9-16 (104)	17-32 (112)	33-64 (120)	
30min	0	0.58	0.27	0.07	0.04	0.02	0.02		45
	0.156	0.55	0.42	0.03					31
	156	0.61	0.22	0.03	0.03	0.03	0.08		36
180min	0	0.44	0.25	0.13	0.13		0.03	0.03	32
	0.156	0.68	0.29	0.03					31
	156	0.59	0.22	0.15	0.04				27

La distribución del número de manchas por mosca (**Tabla VI**) no presentó una proporción considerable de organismos con números extremos de manchas (Kruskall Wallis, $H=4.4418$, $p=0.4877$).

Tabla VI. Distribución de la proporción de moscas silvestres *D. melanogaster* libres de inversión expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario por número de manchas.

t	[μM]	No. alas revisadas	No. de moscas	Número de manchas				Total de moscas
				0	1	2	3	
30min	0	148	74	0.54	0.31	0.15	0.00	74
	0.156	138	69	0.65	0.28	0.04	0.03	69
	156	160	80	0.68	0.21	0.10	0.01	80
180min	0	120	60	0.57	0.35	0.07	0.02	60
	0.156	154	77	0.66	0.29	0.04	0.01	77
	156	140	70	0.69	0.26	0.04	0.01	70

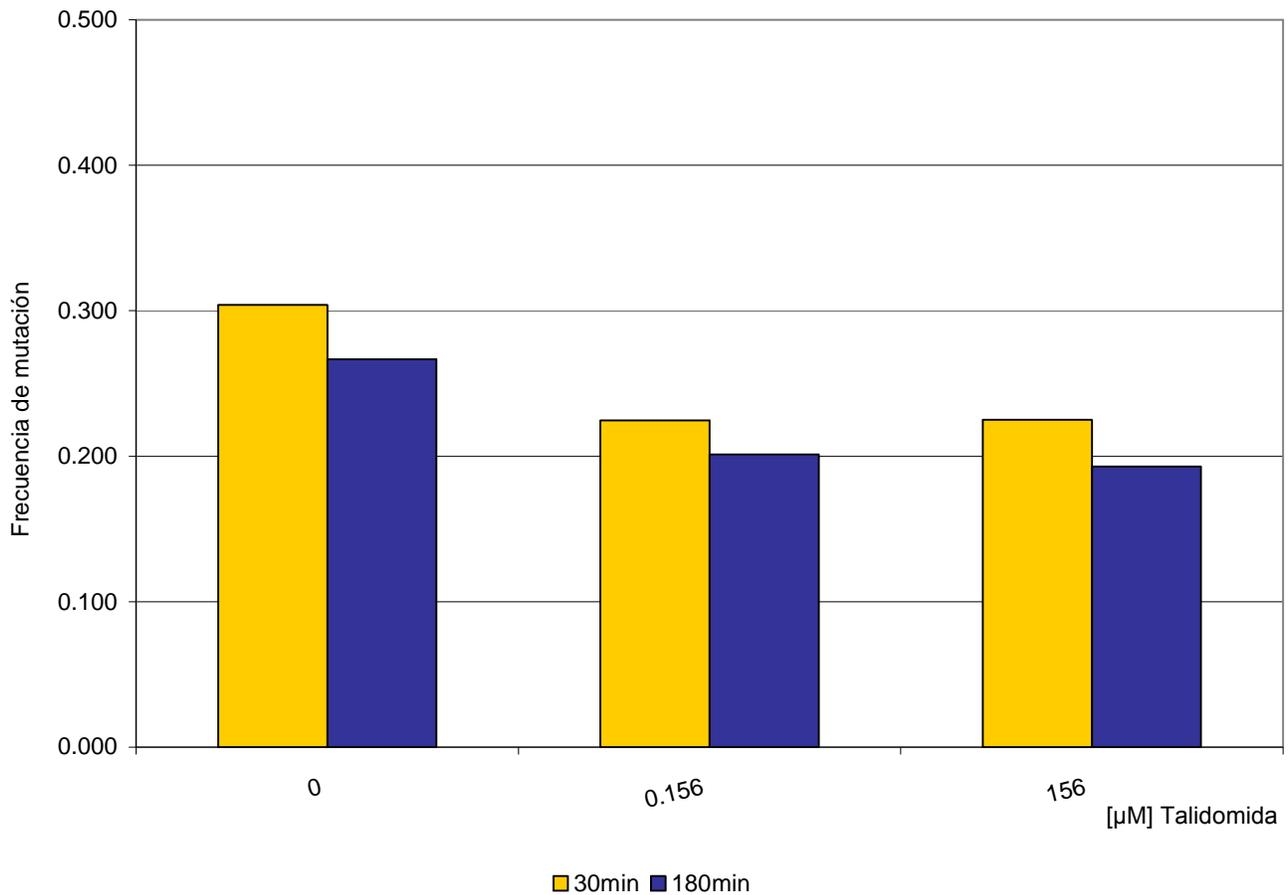


Fig. 7. Frecuencia de mutación en moscas libres de inversión *D. melanogaster* expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario en la Prueba SMART.

Teratogénesis

La evaluación de la teratogénesis se realizó con base en cuatro experimentos con soluciones independientes involucrando a 3720 organismos. De manera general, la proporción de malformaciones inducidas con talidomida fue muy baja. Las moscas testigo, al igual que aquellas expuestas a 0.156 µM durante 180 min no presentaron malformaciones, lo que dificulta la comparación estadística. Las larvas expuestas a 156 µM mostraron en ambos tratamientos (30 y 180 min) un mayor porcentaje de moscas con malformaciones respecto al testigo, sin embargo, el mayor aumento se presentó en aquellas expuestas a 0.156 µM durante 30 min (**Fig. 8**).

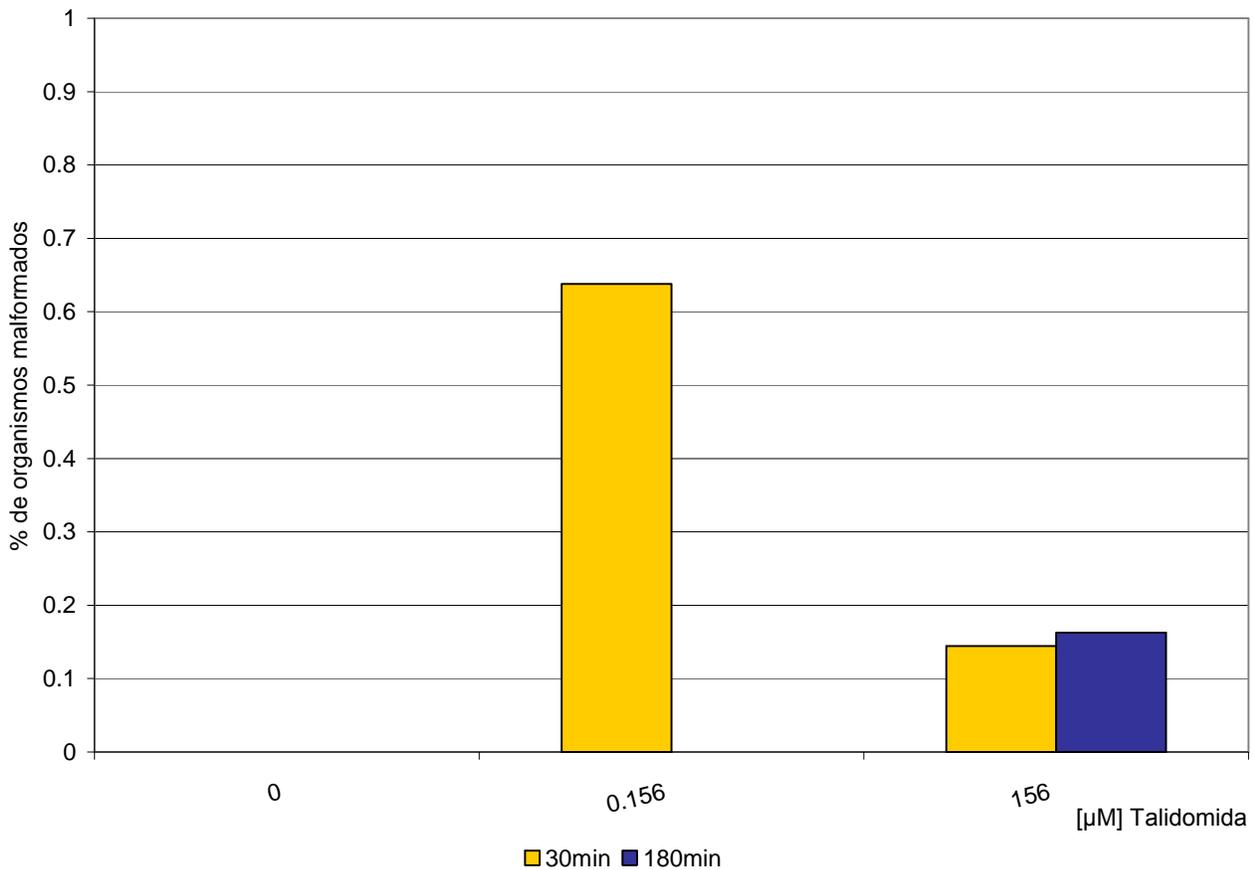


Fig. 8. Proporción de moscas *D. melanogaster* con malformaciones tratadas con talidomida durante el desarrollo larvario

Fertilidad

Las moscas expuestas a 0.156 µM durante 180 min presentaron una disminución en la fertilidad respecto al testigo cercana al 50%. De manera similar a la teratogénesis, las larvas expuestas a 156 µM presentaron en ambos tratamientos (30 y 180 min) una mayor fertilidad, sin embargo, el mayor aumento se presentó en aquellas expuestas a 0.156 µM durante 30min (**Fig.9, Tabla VII**). Por medio de un ANOVA multivariado (**Tabla VIII**) se encontraron diferencias significativas en la fertilidad de las moscas tratadas durante 30 y 180 min, independientemente de la concentración.

Tabla VII. Índice de fertilidad de moscas silvestres *D. melanogaster* expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	1.000	0.000	1.000	0.000
0.156	4.183	1.654	0.565	0.476
156	3.070	0.875	1.570	0.955

Tabla VIII. Análisis multivariado de varianza para el índice de fertilidad de moscas silvestres C-S *D. melanogaster*. expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario.

Factor	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrados Medios del Efecto	Grados de Libertad del Error	Cuadrados Medios del Error	F	p-level
Conc.	2	2.422	6	1.547	1.565	0.284
Tiempo	1	8.732	6	1.547	5.643	0.055
Interacción Conc.-t	2	3.304	6	1.547	2.135	0.199

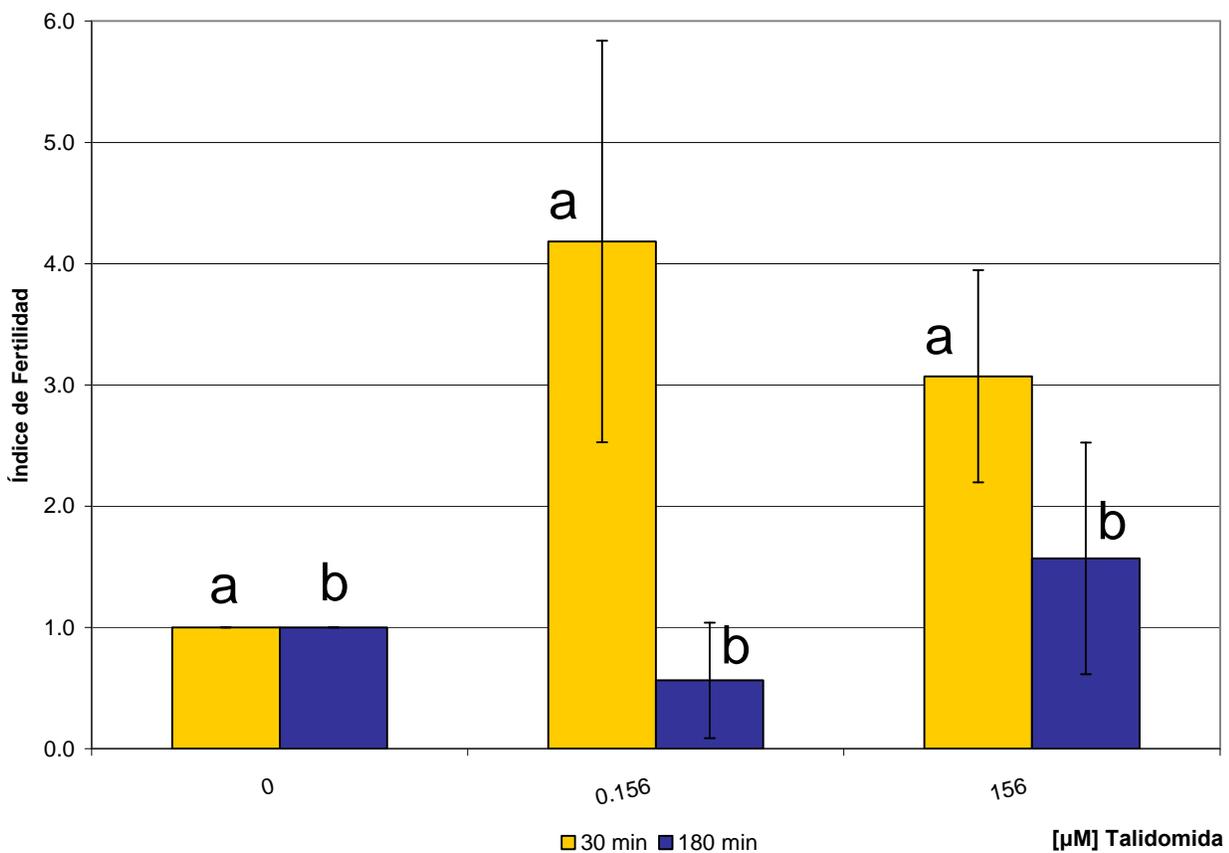


Fig. 9. Índice de Fertilidad de moscas silvestres *D. melanogaster* expuestas a talidomida durante el desarrollo larvario. a y b: grupos estadísticos.

Contenido de proteína total

La concentración de proteína no se modificó de manera significativa en larvas expuestas a talidomida (MANOVA, $p > 0.05$) (**Tabla IX**).

Tabla IX. Contenido de proteína (μg) en 15 larvas silvestres *D. melanogaster* expuestas a talidomida.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	7.203	0.503	6.716	0.628
0.156	7.297	0.342	5.542	0.771
156	6.064	1.0497	6.828	1.073

Contenido de GSH

La concentración de GSH en larvas expuestas (**Tabla X**) no se modificó significativamente por la talidomida (MANOVA, $p > 0.05$), sin embargo, nuevamente en un tratamiento con 0.156 μM (180 min) se presentó un ligero incremento (20%).

Tabla X. Contenido de GSH (μg) en 15 larvas silvestres *D. melanogaster* expuestas a talidomida.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	0.498	0.076	0.404	0.147
0.156	0.527	0.132	0.492	0.050
156	0.494	0.062	0.423	0.077

Contenido de GSSG

La concentración de GSSG en larvas expuestas a talidomida (**Tabla XI**) no fue modificada significativamente por la talidomida (MANOVA, $p > 0.05$), sin embargo, el comportamiento es similar al de las variables anteriores, en los tratamientos por 180min las larvas expuestas a 0.156 μM presentaron un nivel ligeramente menor al testigo y las expuestas a 156 μM un ligero incremento. Sin embargo, en las larvas expuestas a 0.156 μM por 30 min presentaron un incremento del 30% en el contenido de GSSG.

Tabla XI. Contenido de GSSG (μg) en 15 larvas silvestres *D. melanogaster* expuestas a talidomida.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	1.004	0.120	1.298	0.068
0.156	1.309	0.180	1.229	0.026
156	1.135	0.374	1.405	0.248

Experimentos *in vitro*

Citotoxicidad

La viabilidad celular de los cultivos expuestos no se modificó significativamente por la talidomida (MANOVA, $p > 0.05$) (**Tabla XII**).

Tabla XII. Viabilidad Celular de células S2S de *D. melanogaster* expuestas a talidomida.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	100	0	100	0
0.156	95.251	1.455	102.945	0.712
156	102.751	3.330	103.965	1.567

Contenido de Proteína Total

El contenido de proteína en los cultivos S2S (**Tabla XIII**) no se modificó de manera significativa en los tratamientos con talidomida (MANOVA, $p > 0.05$).

Tabla XIII. Contenido de Proteína de cultivos celulares S2S de *D. melanogaster* tratados con talidomida.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	100	0	100	0.00
0.156	112.424	6.131	111.908	4.92
156	108.825	1.778	90.566	1.68

Contenido de GSH

Los cultivos celulares expuestos a 0.156 μ M, de manera similar a las variables anteriores, presentaron un mayor contenido de GSH (**Fig. 10**) independientemente del tiempo de tratamiento respecto al testigo (**Tabla XIV**). Sin embargo, el MANOVA no detectó diferencias estadísticamente significativas (MANOVA, $p > 0.05$).

Tabla XIV. Contenido de GSH (μ g) de cultivos celulares S2S de *D. melanogaster* tratados con talidomida.

[μ M]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	0.761	0.304	0.770	0.116
0.156	1.069	0.472	1.092	0.134
156	0.626	0.270	0.849	0.138

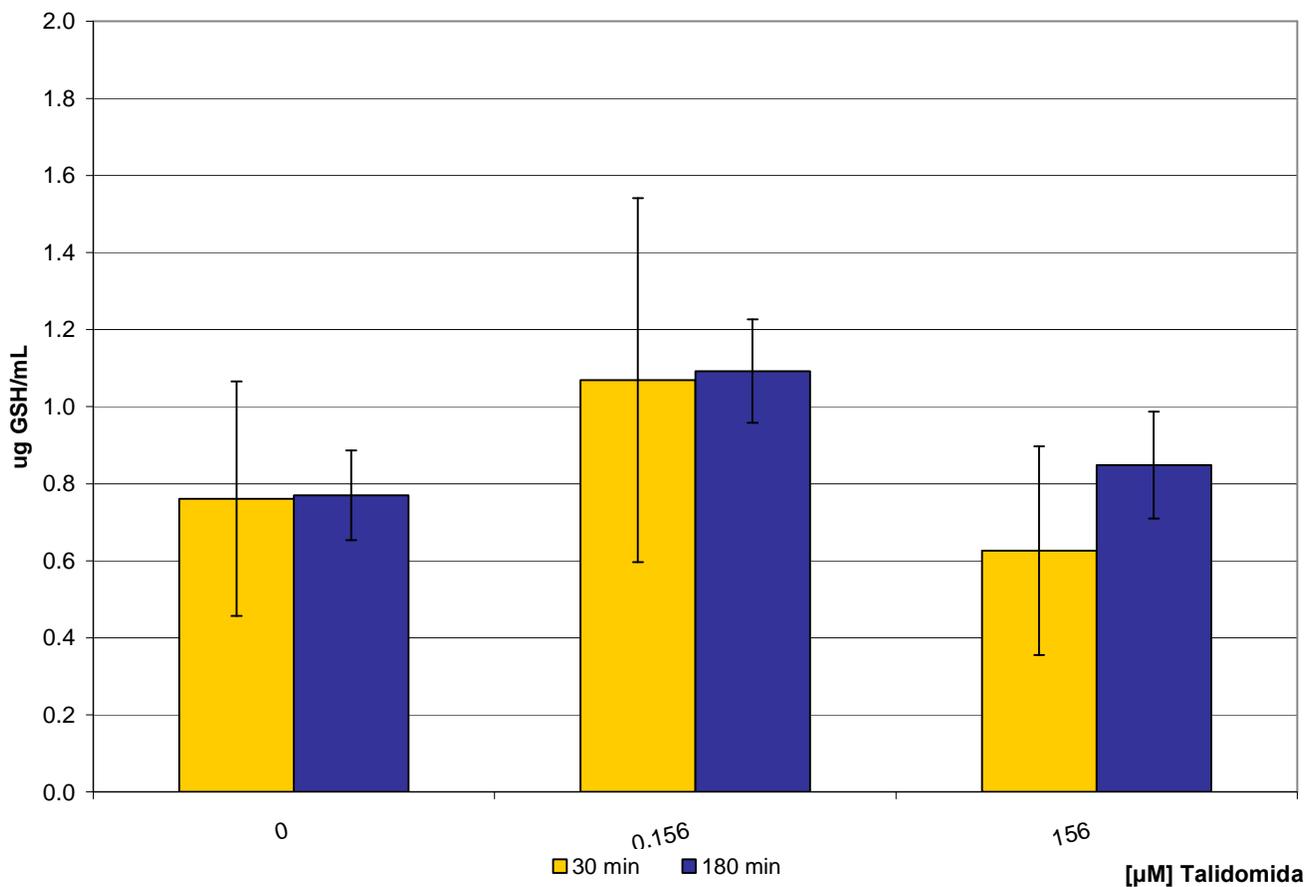


Fig. 10. Contenido de GSH (μ g) en Células S2S de *D. melanogaster* en cultivo expuestas a talidomida.

Contenido de GSSG

El contenido de GSSG (**Tabla XV**) presentó diferencias significativas (**Tabla XVI**) por tiempo de tratamiento y concentración de talidomida. Nuevamente los cultivos expuestos a 0.156µM presentaron el efecto más importante (**Fig. 11**), pues su contenido de GSSG fue significativamente mayor que el del testigo y 156 µM independientemente de la duración del tratamiento ($p < 0.05$), sin embargo entre estos dos no se encontraron diferencias (**Tabla XVII**).

Tabla XV. Contenido de GSSG (µg) de cultivos celulares S2S de *D. melanogaster* expuestas a talidomida.

[µM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	14.965	7.170	3.640	2.688
0.156	29.959	1.165	23.997	4.449
156	19.577	3.889	6.763	5.240

Tabla XVI. Análisis Multivariado de Varianza para el Contenido de GSSG de cultivos celulares S2S de *D. melanogaster* expuestos a talidomida.

Factor	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrados Medios del Efecto	Grados de Libertad del Error	Cuadrados Medios del Error	F	p-level
Conc.	2	345.359	6	40.800	8.465	0.018
Tiempo	1	302.021	6	40.800	7.402	0.035
Interacción Conc.-t	2	12.985	6	40.800	0.318	0.739

Tabla XVII. Diferencias en el Contenido de GSSG en cultivos celulares S2S de *D. melanogaster* expuestos a talidomida según la Prueba de Tukey para grupos homogéneos HSD

[µM] (Media)	0 (9.302)	0.156 (26.978)	156 (13.170)
0		0.019	0.685
0.156	0.019		0.051
156	0.685	0.051	

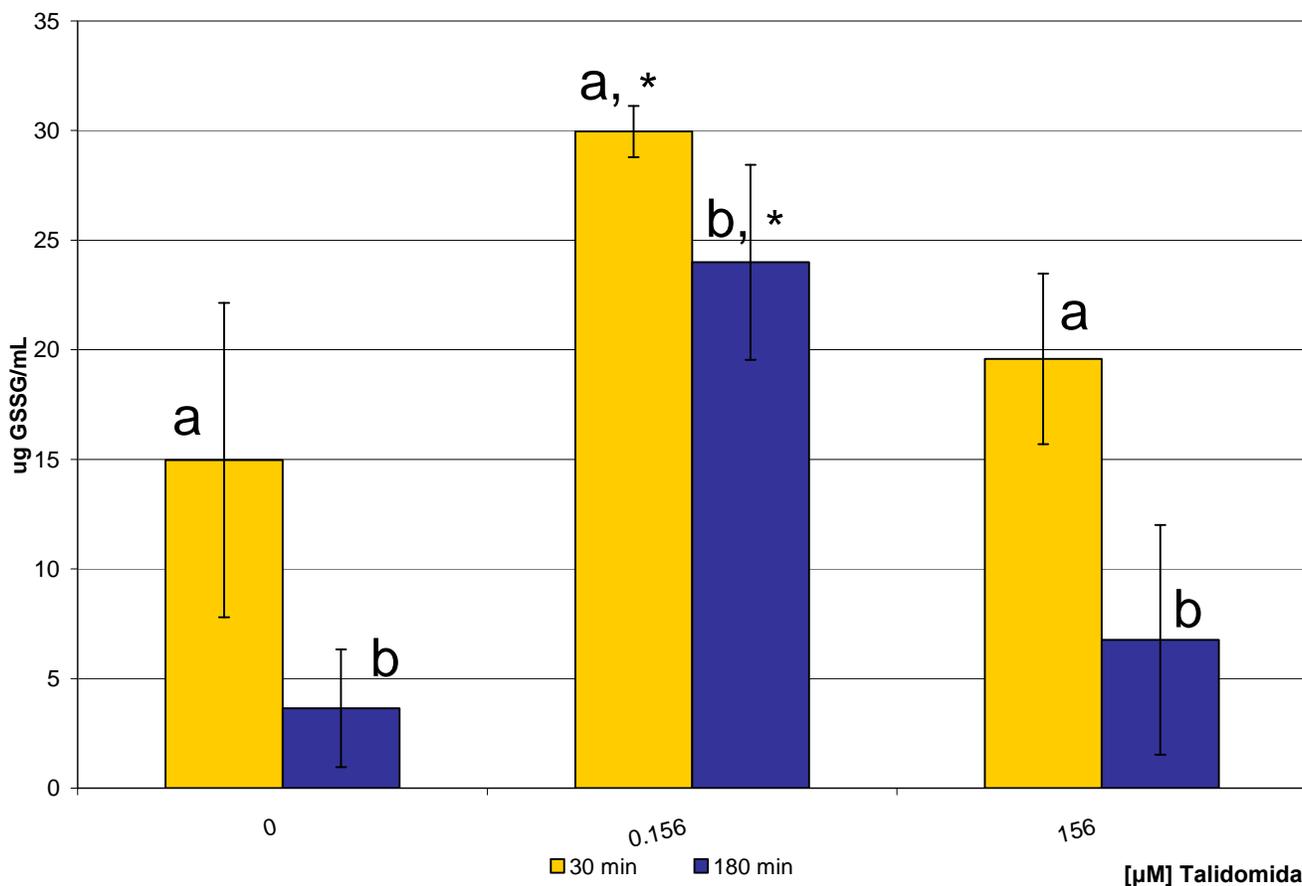


Fig. 11. Contenido de GSSG (ug) de Células S2S en cultivo expuestas a talidomida. a y b: grupos estadísticos; *: diferencias significativas respecto al testigo.

Fosforilación de H2A.x

La proporción de núcleos positivos para H2A.x fosforilada (**Tabla XVIII**) presentó diferencias significativas (MANOVA, $p < 0.05$) (**Tabla XIX**) según el tiempo de tratamiento y concentración de talidomida (**Tabla XX**). De manera contraria a las otras variables, los cultivos expuestos a 180 min fueron los que presentaron un aumento en la variable (100%) (**Fig. 12**), mientras que aquellos expuestos por 30 min presentaron una disminución cercana al 75% respecto al testigo de la fosforilación de H2A.x independientemente de la concentración de exposición.

Tabla XVIII. Proporción de células S2S expuestas a talidomida positivas a inmunotinción de H2A.x fosforilada.

[μM]	30 min		180 min	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
0	0.0231	0.0113	0.0251	0.0107
0.156	0.0043	0.0023	0.0574	0.0166
156	0.0076	0.0045	0.0527	0.0157

Tabla XIX. Análisis Multivariado de Varianza para la Proporción de células S2S expuestas a talidomida positivas a inmunotinción de H2A.x fosforilada.

Factor	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrados Medios del Efecto	Grados de Libertad del Error	Cuadrados Medios del Error	F	p-level
Conc.	2	0.000	73	0.002	0.220	0.803
Tiempo	1	0.021	73	0.002	13.083	0.001
Interacción Conc.-t	2	0.005	73	0.002	3.029	0.054

Tabla XX. Diferencias la proporción de células S2S expuestas a talidomida positivas a inmunotinción de H2A.x fosforilada según la Prueba de Tukey para grupos homogéneos HSD

tratamiento	0 μM , 180 min	0 μM , 30 min	0.156 μM , 180 min	0.156 μM , 30 min	156 μM , 180 min	156 μM , 30 min
0 μM, 180 min		1.000	0.787	0.181	0.885	0.534
0 μM, 30 min	1.000		0.794	0.355	0.882	0.686
0.156 μM, 180 min	0.787	0.794		0.006	1.000	0.072
0.156 μM, 30 min	0.181	0.355	0.006		0.010	1.000
156 μM, 180 min	0.885	0.882	1.000	0.010		0.104
156 μM, 30 min	0.534	0.686	0.072	1.000	0.104	

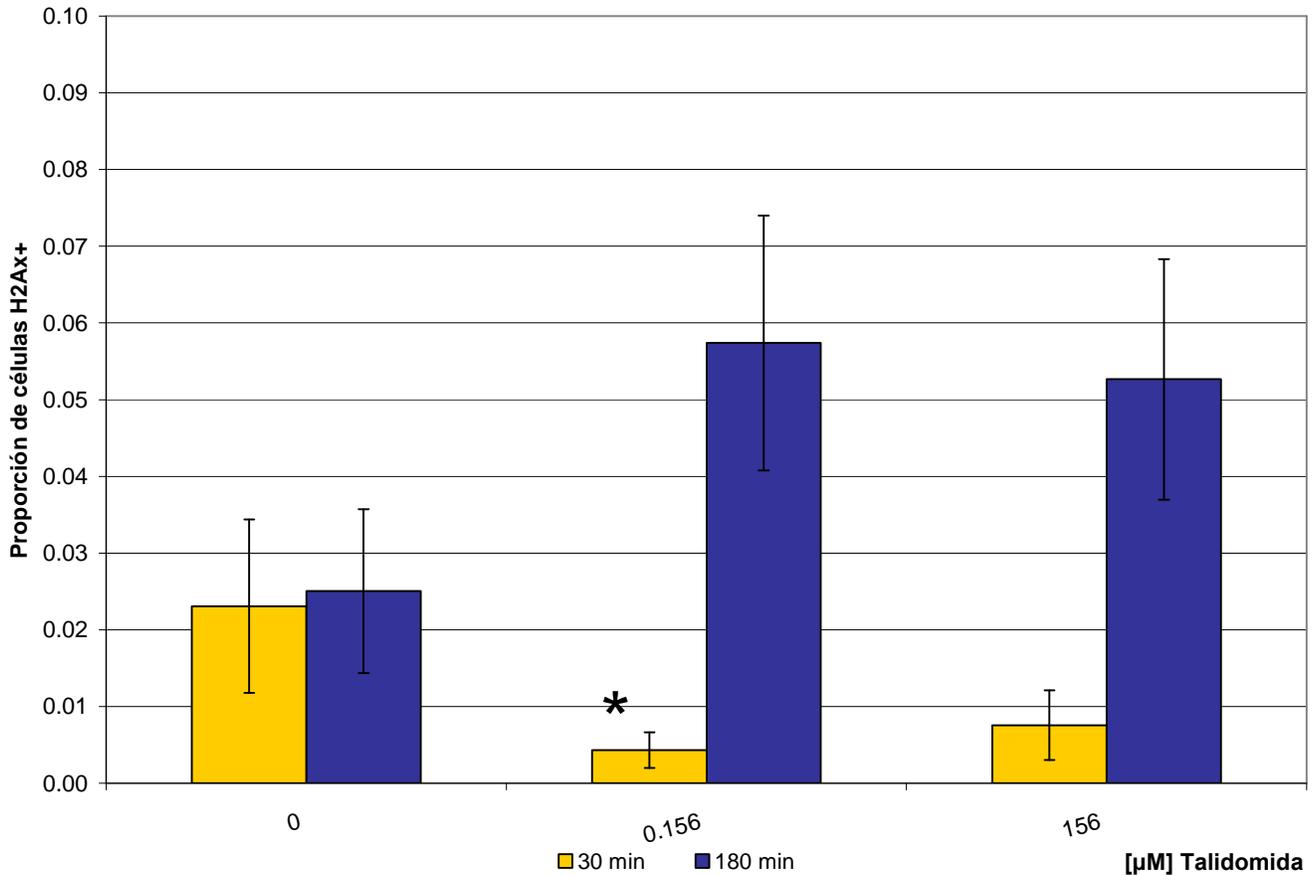


Fig. 12. Proporción de células S2S expuestas a talidomida positivas a inmunotinción de H2A.x fosforilada.
 * diferencias significativas con 0.156 μM 180 min y con 156 μM 180 min.

Cuantificación de RNAm de GSH2

La cuantificación del RNAm de GSH2 no fue posible debido a que no se logró su amplificación por PCR. Sin embargo, la amplificación de un producto de 100pdb de actina fue posible a partir del cDNA sintetizado del RNAm aislado de las células S2S expuestas a talidomida. La técnica de PCR fue verificada mediante la amplificación de un producto del gen RPA34 dentro de un plásmido detectado en gel de agarosa.

DISCUSIÓN

La talidomida es un fármaco conocido por los efectos secundarios que produce en células somáticas de embriones en desarrollo. A pesar de su retiro del mercado hace más de 45 años y su reutilización como tratamiento de diversas enfermedades, su mecanismo de acción y posibles efectos genotóxicos aún no son claros.

En el presente estudio, la talidomida no mostró efectos tóxicos ni citotóxicos estadísticamente significativos en las concentraciones y tiempos de tratamiento probados aunque la citotoxicidad *in vitro* pudo ser subestimada dado que fue evaluada tan sólo 180 min después de la exposición. Las moscas silvestres expuestas a 0.156 μM durante 180 min presentaron un pequeño incremento no significativo en su sobrevivencia del 26% de manera similar al estudio de Ashby *et al.* (1997) que encontró pequeños aumentos en la viabilidad celular de linfocitos humanos en los tratamientos con 12.5 μM de talidomida (17%) y con 300 μM (7%).

En el bioensayo de mutación del gen L5178Y TK^{+/−} en linfoma de ratón y en el de aberraciones cromosómicas en neuroblastos de grillo en el estudio de Ashby *et al.* (1997), la talidomida no produjo daño al DNA, sin embargo, el autor menciona una ligera toxicidad en la concentraciones probadas (0.625, 1.25, 25, 5 mM) y la aparición de células detenidas en profase tardía altamente refractantes con cromosomas inusualmente largos y delgados con extremos pegajosos después de la exposición a 1 mM durante 1 h y tres veces más después de 3 h, respectivamente. Estas células también se presentaron en los tratamientos con S9 después de 1 h de exposición pero desaparecieron después de 3 h, sugiriendo la letalidad del efecto.

Recientemente se ha mostrado la toxicidad de análogos sintéticos de talidomida en líneas celulares humanas de hepatoma (HepG2) mediante el bioensayo de MTT (Wang *et al.*, 2008) y se han relacionado casos de hepatitis (Fowler *et al.*, 2001), neumonitis (Buttin *et al.*, 2007; Wyplosz *et al.*, 2008; Sugimoto, 2009), toxicidad pulmonar aguda (Satkirin *et al.*, 2007), necrosis epidérmica tóxica (Colagrande *et al.*, 2008) y hepatotoxicidad severa (Hanje *et al.*, 2006; Dabak *et al.*, 2008; Levesque *et al.*, 2009) por la ingestión de 50 a 200 mg/d de talidomida. Sin embargo, estos estudios involucran individuos bajo tratamiento para algún proceso canceroso por lo que no ha podido establecerse una relación causal. El rango en el que se han encontrado estos posibles efectos tóxicos corresponden a concentraciones bajas de talidomida biodisponible pues la concentración sanguínea máxima humana alcanzada 4 h después de la ingesta oral de 100 mg es apenas cercana a 3.8 μM , sin embargo, estas concentraciones son muy lejanas a aquellas en las que se han evaluado los efectos genotóxicos de la talidomida.

El estudio realizado en 1997 por Ashby *et al.* en el que se mostró la ausencia de actividad mutagénica de la talidomida involucró concentraciones altas en 32 bioensayos en diversos phyla aunque ninguno en línea germinal. En ese estudio fueron probadas concentraciones superiores de 625 μM en el bioensayo SMART en ojo en *D. melanogaster* y ninguna presentó actividad mutagénica en tratamientos subcrónicos (48 h) con larvas de 72 h. Estudios independientes con una metodología similar (SMART ala) también en *D. melanogaster* (Ramos-Morales *et al.*, 2005) que involucraron concentraciones menores a 625 μM , tampoco encontraron respuesta mutagénica en esta concentración pero sí en concentraciones menores (0.156 μM). A pesar de esto, en el presente trabajo ninguna de las dos concentraciones probadas presentaron actividad mutagénica estadísticamente significativa debido a que aunque es la misma metodología (SMART) en larvas de la misma edad y con

las mismas condiciones que en el trabajo de Ramos-Morales (2005) el tratamiento aplicado no es subcrónico (48 h) sino agudo durante 30 y 180 min.

En todos los tratamientos disminuyó la frecuencia de mutación alrededor de un 26% respecto al testigo, particularmente en los organismos expuestos a 0.156µM aunque ninguna fue estadísticamente significativa. Este mismo fenómeno se muestra en los ensayos en *Salmonella* en el estudio de Ashby *et al.* (1997) donde algunos tratamientos (22 de 60) muestran una reducción de la mutagenicidad de hasta el 24% respecto a su testigo y en los ensayos de mutación del gen L5178Y TK^{+/−} en linfoma de ratón donde la frecuencia de mutación del testigo fue de 2.5 mientras que en los tratamientos con 31 µg/mL, 63 µg/mL, 125 µg/mL y 250 µg/mL de talidomida fue de 1.3, 1.3, 1.1 y 1.8 respectivamente. De manera similar, en el mismo estudio los ensayos en micronúcleos en linfocitos humanos con 2000 µg/mL presentaron una reducción del 59% en el porcentaje promedio de células multinucleadas, pasando de 3.7% en el testigo a 1.5% en el tratamiento y en el número promedio de micronúcleos por 1000 células binucleadas de 2.5 células en el testigo a 1 en el mismo tratamiento. Este comportamiento de frecuencias menores al testigo puede ser obtenido con algunos compuestos citotóxicos con los que una proporción de las células mutantes mueren disminuyendo artificialmente la frecuencia de mutación.

El incremento ligero de la sobrevivencia así como la inducción de mutagénesis en concentraciones bajas en tratamientos subcrónicos (en otros protocolos) y la disminución de esta en tratamientos agudos pueden ser evidencia de actividad de un compuesto ligeramente tóxico y no apoyan la tesis de ausencia de genotoxicidad de la talidomida, sobretodo cuando otros biomarcadores en células somáticas y germinales como la fertilidad y la teratogénesis presentaron actividad. Estas mostraron una tendencia de cambio similar (Pearson, $r=0.89$,

$p=0.02$) aumentando en los organismos tratados con $156 \mu\text{M}$ y mas fuertemente con $0.156 \mu\text{M}$ durante 30 min respecto al testigo de manera independiente a la duración de la exposición. Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio independiente en moscas silvestres que presentaron una mayor fertilidad cuando fueron tratadas con $0.156 \mu\text{M}$ de talidomida (Herrera-Bazán, 2005). Sin embargo, los resultados de teratogénesis son distintos a los del estudio de Ramos-Morales (2005) que muestra una inducción concentración-dependiente de eventos teratógenos en tratamientos subcrónicos (48 h).

Esta tendencia también se presentó en otros marcadores bioquímicos *in vitro* como el aumento en el número de DSB en los tratamientos de 180 min independientemente de la concentración evaluados mediante la fosforilación de H2A.x. Este resultado es similar a lo publicado por Podhorecka *et al.* (2008), donde menciona un aumento en la fosforilación de H2A.x en pacientes y cultivos celulares leucémicos TK6 tratados con talidomida. Los tratamientos durante 30 min presentaron un menor número de DSB inducidos por talidomida que el testigo, quizás debido a la producción de DSB en los tratamientos largos y de SSB (que no inducen la fosforilación de H2A.x) en los tratamientos cortos de 30 min. Este comportamiento se ha encontrado con compuestos como H_2O_2 , que generan OH^\bullet homogéneamente en el entorno celular produciendo SSB en tratamientos agudos y DSB en tratamientos mayores por la acumulación de radicales que aumentan la probabilidad de generarlos como resultado de SSB. Dahm-Daphi *et al.* (2000) proponen que la acumulación de ROS y SSB generadas por H_2O_2 además de aumentar la probabilidad de DSB aumenta la presencia de dobles ataques que son normalmente sólo el 5% de los ataques simples a la hebra de DNA (Siddiqi *et al.*, 1987) donde dos sitios de daño muy cercanos en la misma o en hebras opuestas son causados por el mismo radical. La talidomida puede atravesar

libremente las membranas gracias a su alta lipofiliidad y generar OH^\bullet por su hidrólisis homogéneamente en el entorno celular. Esto ha sido mostrado en experimentos con células CHO expuestas a $387 \mu\text{M}$ de talidomida durante 4 h en los que se mostró la acumulación de ROS (Saber *et al.*, 2000).

Un biomarcador del estrés oxidante generado por talidomida es el contenido de GSH y GSSG. En el presente trabajo los niveles de GSH y de GSSG *in vitro* e *in vivo* expuestos durante 30 min se alteraron de manera similar a la fertilidad y la teratogénesis mostrando el mayor incremento en $0.156 \mu\text{M}$. Sin embargo, recientemente Muñiz *et al.* (2009) ha publicado que el método de Senft no refleja completamente la inducción de GSH2 dado que no logra discriminar entre el producto de GSH2 (GSH) y su sustrato (L- γ -glutamil-L-cisteína) en células S2S expuestas a arsénico donde la síntesis de GSH2 aumentó pero el contenido de GSH medido por el protocolo descrito por Senft *et al.* (2000) se mantuvo sin cambios.

La relación entre la teratogénesis y el estrés oxidante es explicada por muchas vías de transducción de señales críticas en los procesos de desarrollo que son reguladas por parejas redox como GSH y GSSG (Hansen, 2006). Se ha determinado que en tejidos embrionarios de las especies susceptibles a teratogénesis por talidomida como conejos, ésta causa oxidación en DNA pero no lo hace en las especies resistentes como ratón (Wells *et al.*, 2005). Esta resistencia está basada en la capacidad de la defensa antioxidante dependiente de glutatión (Knobloch *et al.*, 2008 b) tal que los efectos adversos en desarrollo por la exposición *in utero* a talidomida pueden ser modulados alterando vías que controlan el balance embrionario de ROS (Wells *et al.*, 2009). Así, el mecanismo teratogénico de talidomida ha sido explicado por Knobloch *et al.* (2008 a). por la supresión de los genes Wnt

y ATK por el estrés oxidante generado por la hidrólisis de talidomida produciendo apoptosis durante el desarrollo embrionario de limbos y originando focomelia (Knobloch *et al.*, 2008 a). De cualquier manera sería importante conocer la oxidación de biomoléculas mediante el uso de marcadores específicos como el malondialdehído o el 4-hidroxi-nonenal para ácidos grasos, o la 8-hidroxiguanina para ácidos nucleicos, así como el número específico de SSB y DSB generados por la exposición a talidomida utilizando métodos como el propuesto por Dahm que consiste en el desenrollamiento por alcalinidad de la hebra de DNA o electroforesis neutral de campo constante (Dahm-Daphi *et al.*, 2000).

La generación de ROS podría explicar los cambios en los diferentes biomarcadores utilizados en este trabajo pues tanto la fertilidad, la teratogénesis y los cambios en el contenido de GSH y GSSG presentan un efecto mayor en los tratamientos durante 30 min o con 0.156 μM y un menor efecto en los tratamientos durante 180 min o en 156 μM donde el estrés oxidante es mayor al igual que el daño a DNA (fosforilación de H2A.x) y la desregulación de la pareja 2GSH/GSSG puede activar otros mecanismos antioxidantes que controlan la desregulación del estrés oxidante causado por la hidrólisis de talidomida, de tal manera que los cambios en el estado redox celular determinan de manera importante los efectos en los organismos ante la exposición a bajas y altas concentraciones de talidomida.

Estos resultados colaboran a entender el papel del estrés oxidante como el mecanismo de acción de la talidomida y evidencian la urgencia de estudios y políticas que permitan la evaluación y el establecimiento del riesgo humano por el uso de talidomida ante el creciente uso de este medicamento en el tratamiento de diversas enfermedades sin existir lineamientos de edad, vías de administración, dosis y duración del tratamiento.

CONCLUSIONES

- 1.- La talidomida no fue letal ni citotóxica en las concentraciones y tiempos de tratamiento probados.
- 2.- La talidomida disminuyó la frecuencia de mutación en moscas expuestas durante el desarrollo larvario en todas las concentraciones y tiempos de tratamiento probados.
- 3.- La talidomida indujo rompimientos de doble hebra de DNA en células S2S expuestas durante 180 min, pero cuando fueron expuestas a 30 min el número de rompimientos disminuyó por debajo del nivel del testigo.
- 4.- La talidomida no modificó el contenido de proteína total en larvas ni en células S2S expuestas.
- 5.- La talidomida produjo un aumento en el contenido de GSH y GSSG tanto *in vitro* como *in vivo* en los tratamientos con 0.156 μM durante 30 min, de manera similar a la fertilidad y a la teratogénesis.
- 6.- El estrés oxidante generado por la hidrólisis espontánea de la talidomida está relacionado con la frecuencia de alteraciones somáticas en *Drosophila melanogaster* expuestas a concentraciones bajas de genotóxicos.



Dixon's Lab., 2007
Molecular and Cellular Biology Department
The University of Arizona

REFERENCIAS

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. 2000. **The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster***. *Science*. 287(5461):2185-2195
- Andäng M, Hjerling-Leffler J, Moliner A, Lundgren TK, Castelo-Branco G, Nanou E, Pozas E, Bryja V, Halliez S, Nishimaru H, Wilbertz J, Arenas E, Koltzenburg M, Charnay P, El Manira A, Ibañez CF, Ernfors P. 2008. **Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation**. *Nature*, 451(7177):460-4
- Andres AJ, Cherbas P. 1992. **Tissue-specific ecdysone responses: regulation of the *Drosophila* genes *Eip28/29* and *Eip40* during larval development**. *Development*. 116(4):865-876
- Andres AJ, Cherbas P. 1994. **Tissue-specific regulation by ecdysone: distinct patterns of *Eip28/29* expression are controlled by different ecdysone response elements**. *Dev. Genet* 15(4):320-331
- Andreyeva EN, Kolesnikova TD, Belyaeva ES, Glaser RL, Zhimulev IF. 2008. **Local DNA underreplication correlates with accumulation of phosphorylated H2Av in the *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes**. *Chromosome Res*. Aug 16.
- Arellano, O. 2002. ***Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los Azufres, Mich.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 51p
- Ashburner M, Thompson JN 1978. **The laboratory culture of *Drosophila***. In: The genetics and biology of *Drosophila*. (Ashburner M, Wright TRF (eds.)). Academic Press, volume 2A: pp. 1–81
- Ashby H., Tinwell R.D., Callander I., Kimber P., Clay S.M., Galloway R.B., Hill, S.K. Greenwood, M.E. Gauden, M.J. Ferguson, E. Vogel, M. Nivard, J.M. Parry, J. Williamson. 1997. **Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints**. *Mutation Research*. 396:45-64
- Aten J., Stap J., Krawczyk P., van Oven C., Hoebe R., Essers J., Kanaar R. 2004. **Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains**. *Science* 303:92-95
- Ausio J, Abbott DW. 2002. **The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function**. *Biochemistry* 41: 5945–5949
- Ávalos-Díaz E., Guzmán-Enríquez L, López-Robles E, Herrera-Esparza R. 1985. **Inhibitory effect on endocytosis in polymorphonuclear cells caused by thalidomide**. *Arch Invest Med (Mex)*. 16(2):139-143

- AVITE. Asociación de Víctimas de la Talidomida en España. (<http://www.avite.org>)
- Barron AB, .2000. **Anaesthetising Drosophila for behavioural studies.** *Journal of Insect Physiology* 46(4) :439-442
- Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW. 2002. **Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2A.x.** *Proc Natl Acad Sci U SA.*99(12):8173-8.
- Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C, Alt FW. 2003. **Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors.** *Cell.* 114(3):359-70.
- Benda CE, Baughman FA. 1963. **Slight aneuploidy and multiple CA in the peripheral blood of thalidomide victims.** *Med. Welt.* 2:1661
- Bradford. 1976 **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Braun AG, Harding FA, Weinreb S.L. 1986. **Teratogen metabolism: Thalidomide activation is mediated by cytochrome P 450.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82:175-179
- Breen AP, Murphy JA. 1995. **Reactions of oxyl radicals with DNA.** *Free Radic. Biol. Med.* 18:1033-1077
- Buttin BM, Moore MJ. 2007. **Thalidomide-induced reversible interstitial pneumonitis ina a patient with recurrent ovarian cancer.** *Gynecologic Oncology.* 111(3):546-548.
- Calabrese EJ, Baldwin LA. 1998 a. **Hormesis as a biological hypothesis.** *Environmental Health Perspectives* 106, Suplemento 1
- Calabrese EJ, Baldwin L.A. 1998 b. **Can the concept of hormesis be generalized to carcinogenesis?** *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 28:230-241
- Calabrese EJ, Baldwin L.A. 2001. **Hormesis:U-shaped dose response and their centrality in toxicology.** *Trends inPharmacological Science.* 22(8):285-291
- Calbiochem. 2003. **Thalidomide Safety Data Sheet.** Catalog#585970
- Casarett L.J, Doull J. 1975. **Toxicology. The Basic Science of Poisons.** Macmillan Publishing.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. 2002. **Genomic instability in mice lacking histone H2AX.** *Science.* 296(5569):922-7
- Celeste A., Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A. 2003. **H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility.** *Cell.* 114(3):371-83.
- Childress J, Behringer R, Halder G. **Learning to Fly. Phenotypic markers in Drosophila.** Poster. Leica McCord-Wiley InterScience.
- Clark AM. 1982. **The use of larval stages of Drosophila in screening for some naturally occurring mutagens.** *Mutation Research* 2:89-97
- Colagrande, M; Di Ianni, M; Coletti, G; Peris, K; Fagnolli, MC; Moretti, L; Lapecorella, M; Tabilio, A. 2008. **Toxic Epidermal necrolysis in a patient with primary myelofibrosis receiving thalidomide therapy.** *Int. J. Hematol. In Press*

- Dabak V, Kuriakpse, P. 2008. **Thalidomide-induced severe hepatotoxicity.** *Cancer Chemother Pharmacol. En prensa.*
- Dahm-Daphi, J., Sab C., Alberti W. 2000. **Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells.** *Int. J. Radiat. Biol.* 76(1):67-75
- D'amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J.1994. **Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4082-4085.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. 2000. **A role for Saccharomyces cerevisiae histone H2A in DNA repair.** *Nature.* 408(6815):1001-4. 24(14):6215-30.
- Frei HJ, Würigler FE. 1995. **Optimal experimental design and simple size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in Drosophila.** *Mutation Research* 334:247-258
- Frei HJ, Würigler FE. 1988. **Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result.** *Mutation Research* 203:297-308
- Freya Q, Schafer, Buettner G. Redox 2001. **Environment Of The Cell As Viewed Through The Redox State Of The Glutathione Disulfide/Glutathione Couple.** *Free Radical Biology & Medicine,* 30(11):1191–1212.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. 2006. **DNA Repair and Mutagenesis.** Washington, D.C. ASM Press.
- Fowler R, Imrie K. 2001. **Thalidomide-associated hepatitis: a case report.** *Am. J. Hematol.* 66(4):300-2
- García Bellido A, Merriam JR. 1971. **Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster.** *Developmental biology* 24:61-87)
- Gordon G. 1981. **Mutagenic and cytotoxic studies with thalidomide.** *Thesis (Ph. D.)--Johns Hopkins University*
- Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. **Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster.** *Environ Mutagen* 6(2):153-88.
- Halliwell B, Gutteridge JE. 1995. **Free Radicals in Biology and Medicine,** ed 2. Oxford
- Hällström I, Sundvall A, Rannug U, Grafström. 1981. **The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcelular fractions of Drosophila melanogaster. I. Activation of vinyl chloride, 2-aminoanthracene and benzo(α)pyrene as measured by mutagenic effects in Salmonella typhimurium.** *Chem. Biol. Interactions,* 34:129-143
- Hällström I, Grafström. 1981. **The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcelular fractions of Drosophila melanogaster. II. Enzyme induction and metabolism of Benzo(α)pyrene.** *Chem. Biol. Interactions,* 34:145-159
- Hällström I, Magnusson J, Ramel C. 1982. **Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in Drosophila melanogaster.** *Mutation Research* 92:161-168)
- Hanje AJ, Shamp JL, Thomas FB, Meis GM. 2006. **Thalidomide-induced severe hepatotoxicity.** *Pharmacotherapy.* 26(7):1018-22.
- Hansberg TW, 2002. **Biología de las especies de oxígeno reactivas.** *Mensaje bioquímico* 26:19-54
- Hansen JM, Carney EW, Harris C. 1999. **Thalidomide-induced alterations of glutathione status in organogenesis stage rat and rabbit conceptuses in vitro.** *Reprod Toxicol* 13:547–554.

- Hansen JM. 2006. **Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis**. Review. Birth Defects Research Part C: *Embryo Today: Reviews*. 78(4):293 - 307
- Herrera-Bazán JJH. 2005. **Efecto de Concentraciones Bajas de Talidomida en la Fertilidad de Moscas (*Drosophila melanogaster*) Expuestas Durante el Desarrollo Larvario**. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México, Distrito Federal.
- Huang PHT, McBride WG. 1990. **Thalidomide induced alteration in secondary structure of rat embryonic DNA *in vivo***. *Teratog. Carcinog Mutagen*. 10:281-294
- Huang PHT, McBride WG. 1997. **Interaction of (glutaramido-2-14-C)-thalidomide with rat embryonic DNA *in vivo***. *Teratog. Carcinog Mutagen*. 17:1-5
- Jason MH, Katie KH, Martin AP y Craig H. 2002 **Thalidomide modulates Nuclear redox status and preferentially depletes Glutathion in Rabitt limb versus Rat Limb**. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*200:768-76
- Jensen MK. 1965. **Chromosome aberrations in human cells induced by thalidomide *in vitro***. *Acta. Med. Scand*. 177:783-784
- Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Muller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer R, Becker K.. 2001. **Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster***. *Science*. 26;291(5504):643-6.
- Kemper F. 1962. **Thalidomide and congenital abnormalities**. *Lancet*. 2:836
- Knobloch J, Rütther U. 2008 a. **Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects**. *Cell Cycle*. 7(9):1121-1127
- Knobloch J, Reimann K, Klotz LQ, Rütther U. 2008 b. **Thalidomide Resistance is Based on the Capacity of the Glutathione-Dependent Antioxidant Defense**. *Mol. Pharm. En Prensa*.
- Krinsky NI. 1992. **Mechanism of action of biological antioxidants**. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 248-254
- Kuo L.J, Yang LX. 2008. **γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks**. *In Vivo*. 22(3):305-9.
- Lai P, Palmieri G. 1970. **The Influence of Thalidomide on reproductive Capacity in the Cock**. *Eur. J. Toxicol*. 3(2):103-106
- Levesque E, Bradette M. 2009. **Hepatotoxicity as a rare but serious side effect of Thalidomide**. *Ann. Hematol*. 88:183-184
- Lindsley D, Grell EH. 1972. **Genetic Variation of *Drosophila melanogaster***. Washington, DC. Carnegie Institution, 472 p
- Lindsley D, Zimm. 1992. **The Genome of *Drosophila melanogaster***. Academic Press.
- Mackenzie D. 1983. **Secret test say thalidomide is mutagenic**. *New Scientist*. 457
- Madigan JP, Chotkowski HL, Glaser RL. 2002. **DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis**. *Nucleic Acids Res*. 30(17):3698-705.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS.2001. **Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis**. *Nat Genet*. (3):271-6.
- Marnett LJ. 2000. **Oxyradicals and DNA damage**. *Carcinogenesis* 21: 361:370
- McBride WG. 1994. **Thalidomide may be a mutagen**. *BMJ*. 308:1635-1636

- Meister A, Anderson ME. 1983. **Glutathione**. *Ann. Rev. Biochem.*52:711
- Miller MT, Strömmland K. 1999. **Teratogen Update: Thalidomide: A Review, With a Focus on Ocular Findings and New Potential Uses**. *Teratology* 60:306–321
- Missirlis F, Stefan R, Nikolaos D, Holger B, Katja B, Arthur H. 2003. **A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity**. *Biological chemistry* 384(3):463-472
- Mitchell I, Combes R. 1984. **Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster***. En: S.Venitt y J.M. Parry *Mutagenicity testing a practical approach*. IRL Press, IK. 149-155pp
- Moos RV, Stolz R, Cerny T, Gillessen S. 2003. **Thalidomide: from tragedy to promise**. *Swiss. Med. Wkly.* 133:77-87
- Müller H J, 1927 . **Artificial transmutation of the gene**. *Science* 66:84-87.
- Muñiz OJ, Opoka R, Kane D, Cartwright I. 2009. **Investigating Arsenic Susceptibility from a Genetic Perspective in *Drosophila* Reveals a Key Role for Glutathione Synthetase**. *Toxicological Sciences* 107(2):416-426.
- Nakamura TM, Du LL, Redon C, Russell P. 2004. **Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast**. *Mol Cell Biol.*
- Nordberg J, Arner ES 2001. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system**. *Free Radic.Biol.Med.* 1;31(11):1287-312.
- Nöthinger R. 1970. **Sucrose Density Separation: A Method for Collecting Large Number of *Drosophila* larvae**. *Dros. Inf. Serv.* 45:177
- Parman T, Wiley MJ, Wells PG. 1999. **Free Radical Mediated Oxidative DNA Damage in the Mechanism of Thalidomide Teratogenicity**. *Nat. Med.* 5:582-585
- Patil CR, Bhise SB. 2003. **Re-emergence of Thalidomide**. *Indian Journal of Pharmacology.* 35:204-212
- Podhorecka M, Halicka HD, Klimek P, Kowal M, Dmoszynska A. 2008. **Thalidomide induces phosphorylation of histone H²AX and increases rate of apoptosis caused by fludarabine in malignant lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia in short-term cell cultures**. *Leuk. Res. En Prensa.*
- Ramos-Morales P, Muñoz-Moya A, Muñoz-Hernández A, Rivas-Martínez H, Hernández-Bernal B, Herrera - Bazán JJH. 2002. **Thalidomide: A mutagen at low concentrations?**. En: Environmental Mutagen Society Annual Meeting. Anchorage, Alaska, USA. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 39(S33):51.
- Ramos-Morales P, Herrera Bazan J, Muñoz-Hernández A, Muñoz-Moya A, García Martínez V, Rivas-Martínez H, Hernández-Bernal B. 2005. **Thalidomide induce malformations, somatic recombination and interfere the fertility of flies exposed through development**. En: 9th Internacionl Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The Environmental Mutagen Society.San Francisco, California, USA. *Mutation Research–Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.*
- Redon D, Pilch E, Rogakou O, Sedelnikova K, Newrock, Bonner W. 2002. **Histone H2A variants H2AX and H2AZ**, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, pp. 162–169
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. **DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139**. *J Biol Chem.* 273(10):5858-68.
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson H, Löbrich M. 2003. **Pathways of DNA-double strand break repair during the mammalian cell cycle**. *Mol. Cell.Biol.* 23:5706-5715)
- Roux C, Emerit I, Taillemite JL. 1971. **Chromosomal breakage and teratogenesis**. *Teratology* 4(3):303-15.

- Satkirin K, Khalsa, Catherine C, Roberts, Michael S, Underhill. 2007. **Acute Pulmonary Toxicity from Thalidomide in a Patient with Multiple Myeloma.** *Radiology Case Reports.* 2(3):41-43
- Sauer H, Günther J, Hescheler J, Wartenberger M. 2000. **Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals.** *American Journal of Pathology,* 156(1):151-158
- Schneider. 1972. **Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*.** *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27: 353
- Sekhar M, Lamothe B, Aggarwal B. 2002. **Thalidomide Suppresses NF- κ B Activation Induced by TNF and H₂O₂, But Not That Activated by Ceramide, Lipopolysaccharides, or Phorbol Ester.** *The Journal of Immunology,* 168: 2644–2651.
- Senft A, Dalton T, Shertzer H. 2000. **Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using Fluorescent Probe o-Phthalaldehyde.** *Analytical Biochemistry* 280:80-86
- Siddiqi M, Bothe E. 1987. **Single- and double- strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration.** *Radiation Research,* 112:449-463
- Sikka SC. 1996. **Oxidative Stress And Role Of Antioxidants In Normal And Abnormal Sperm Function.** *Frontiers in Bioscience* 1, e78-86
- Smithells RW, Newman CGH. 1992. **Recognition of Thalidomide Defects.** *J. Med. Genet.* 29(10):716-23
- Stebbing ARD. 1997. **A theory for growth hormesis.** *BELLE News* l. 6:1-11
- Sugimoto K. 2009. **Thalidomide may induce interstitial pneumonia preferentially in Japanese patients.** *European Journal of Haematology* 82(1):73-74
- Taussig HB. 1962. **The Thalidomide Syndrome.** *Scientific American.* 207(2):29-35
- Teo S. 2000. **Assessment of the In Vitro and In Vivo Genotoxicity of Thalomid® (Thalidomide).** *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 20:301-311
- Teo SK, Denny KH, Stirling DI, Thomas DT, Morseth ML, Hoberman AM. 2004. **Effects of thalidomide on reproductive function and early embryonic development in male and female New Zealand white rabbits.** *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology.* 71(1): 1-16
- Teo SK. 2005. **Properties of Thalidomide and its Analogues: Implications for Anticancer Therapy.** *AAPS Journal,* 7(1):E14-E19
- Ugalde A, Homedes N. 2007. **Cincuenta años después de una tragedia: ¿Se ha avanzado desde que talidomida salió al mercado?** *Boletines FÁrmacos. Instituto Borja de Bioética.* 10(5)
- Wang T, Hua Zhang Y, Yu S, Ji H, Shgn Lai Y, Xun Peng S. 2008. **Synthesis and biological evaluation of novel thalidomide analogues as potential anticancer drugs. NK.** *Chinese Chemical Letters.* 19(8):928-930
- Ward JF. 1998. **DNA damage produced by ionizing radiation on mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability.** *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35:95-125
- Wells PG. 1997. **Oxidative Damage in chemical teratogenesis.** *Mutation Research* 380 (1-2)
- Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, Kim PM, Laposa RR, McCallum GP, Nicol CJ, Parman T, Wiley MJ, Wong AW. 2005. **Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207(2 Suppl):354-366.
- Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, Preston TJ, Wiley MJ, Wong AW. 2009. **Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits and Cancer.** *Toxicol. Sci. En Prensa.*

Williams GM, Jeffrey AM. 2000. **Oxidative DNA Damage: Endogenous and Chemically Induced.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 32:283-292

Winn LM, Wells PG. 1997. **Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo- α pyrene teratogenesis.** *Free Radic Biol Med*, 22:607–621

Wyplosz B, Lerolle U, Israel-Biet D, Dougados J, Lillo-Le Louet A, Ghez D, Pouchot J. 2008. **Thalidomide-induced pneumonitis.** *European Journal of Internal Medicine*. 19(7):e57-e58.

Xinuy Z., Ying PZ, Gilles K, Rosenkranz H. 1999. **Thalidomide and metabolites: Indications of the Absence of genotoxic carcinogenic potentials.** *Mutation Research*. 425:153-167

ANEXO I. SOLUCIONES

Ácido tricloroacético al 5%, TCA 5%

Disolver 2.5 mL de ácido tricloroacético en 50 mL de RQB

Bradford, solución de

Disolver 25 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 12.5 mL de etanol 95%.

Agregar 25 mL de ácido fosfórico.

Aforar a 250 mL con agua destilada.

Mantener en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Buffer A

Mezclar y aforar a 100mL con agua desionizada

1.148 g KCl

0.1966 g DTPA

0.3851 g KH_2PO_4

1.2488 g K_2HPO_4

Buffer B

Mezclar y aforar a 100mL con agua desionizada

0.3284 mL HCl

0.3693 g DTPA

0.3522 g Ácido ascórbico

10 g Ácido tricloroacético

Buffer de fosfatos 1M

Mezclar, aforar a 100 mL con agua desionizada y ajustar pH a 7

5.24 g KH_2PO_4

10.71 g K_2HPO_4

Buffer de fosfatos 0.1M

Mezclar, aforar a 250mL con agua desionizada y ajustar pH a 6.9

2.74 g KH_2PO_4

3.46 g K_2HPO_4

Fauré, goma de montaje

Mezclar y dejar reposar en frascos ámbar a temperatura ambiente para aclarar la solución.

30 g goma arábiga,

20 mL glicerol,

50 g hidrato de cloral

50 mL agua

Glutación 0.1mM, GSH

Disolver 0.0003 g por cada 1 mL de TCA5% para preparar una solución 1 mM. Agregar 2 mg de zinc por cada mL de solución GSH 1 mM, agitar fuertemente, centrifugar, y filtrar con papel (0.2 μm). Diluir a 0.1 mM con TCA 5% Esta solución debe de ser preparada el mismo día que se utilizará.

Glutación disulfuro, GSSG

Disolver 0.0006 g en 1 mL de TCA 5%. Esta solución debe de ser preparada el mismo día que se utilizará.

Hidrosulfito de sodio 100 mM, DT

Disolver 0.0174 g en 1 mL de RQB. Esta solución debe de ser preparada el mismo día que se utilizará.

Medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*

Para 1 L de medio, revolver en seco:

- 10g carragenina,
- 105.5 g harina de maíz,
- 145 g azúcar,

agregar 1250 mL de agua y poner 20 min a fuego bajo después de alcanzar ebullición. Agregar 72.5 g levadura desamarrada de cerveza disuelta en 200 mL agua y dejar 20 min a ebullición. Agregar 4 mL de nipagin 10% en etanol y 4 mL de ácido propiónico (SIGMA P 1386). Servir en frascos estériles tibios y dejar cuajar a temperatura ambiente.

Medio de cultivo M3 para línea celular S2S

Disolver 39.3 g de Shields and Sang powdered médium (Sigma S-8398) por litro de agua desionizada y esterilizar por filtrado. Suplementar con:

- 0.5 g/L KHCO₃ (Sigma, P-7682)
- 1 g/L extracto de levadura (Sigma Y-1000)
- 2.5 g/L bactopectona (Difco 211677)
- 12.5% v/v suero fetal bovino (FBS)

MTT, sales de tetrazolio

Disolver 5 mg de MTT en 1 mL de agua desionizada. Esterilizar por filtración (0.2 µM). Guardar este stock a -80°C. Para utilizarlo agregar 1 parte de la solución stock MTT por 10 de medio de cultivo celular.

N-etilmaleimida, NEM

Disolver 0.0009 g en 1 mL de RQB. Esta solución debe de ser preparada el mismo día que se utilizará.

o-phthaldialdehyde, OPT

Disolver 0.025 g en 5 mL de metanol y guardar en frasco ámbar en oscuridad. Esta solución debe de ser preparada el mismo día que se utilizará.

Redox quenching buffer, RQB

Mezclar y aforar a 100 mL con agua desionizada

- 0.1642 mL HCl
- 0.1966 g DTPA
- 0.1761g ácido ascórbico

Solución de lisis para MTT

Preparar una solución de HCl 0.1 N en isopropanol absoluto y guardar en frasco de vidrio a temperatura ambiente. Para utilizarla, agregar 1 parte de solución de lisis por cada parte de medio de cultivo.

Anexo II. METODOLOGÍA

Experimentos *in vivo*

Todas las cepas fueron mantenidas en medio de cultivo estándar a 25°C y 60% de humedad relativa en un ambiente libre de patógenos. Los cultivos maduros fueron transvasados cada 15 días y cuando fue necesario las moscas se anestesiaron para su manipulación con éter etílico anhidro (SIGMA 346136), contadas y revisadas bajo microscopio estereoscópico Nikon (SMZ645), sacrificadas por sobreeterización y preservadas en etanol al 70%. El material utilizado fue de cristal esterilizado con horno seco a 300°C durante 1 h.

Moscas hembras de la cepa C-S y *flr*³ fueron aisladas vírgenes por observación del meconio (Barron, 2000) y cruzados con machos C-S y *mwh*, respectivamente para obtener una cruce controlada que fue madurada durante 5 días y posteriormente las moscas fueron puestas en medio de cultivo fresco permitiéndoles ovopositar por cuatro horas, tras las cuales fueron regresadas a sus frascos originales, con el fin de sincronizar la edad del cultivo. Tres días después, las larvas de 72±2 h de edad se extrajeron por flotación utilizando una solución concentrada de sacarosa según la técnica de Nöthinger (Nöthinger, 1970) evitando la manipulación directa y la exposición a temperaturas extremas. Las larvas fueron puestas en trampas (tubos de vidrio de 1.5 cm de diámetro con una gasa de nylon de 1 mm de poro) y sumergidos en un vaso de polipropileno con 2 mL de la solución de talidomida a probar y 150 mg de celulosa microgranulada (SIGMA). Las soluciones probadas fueron 156 µM, 0.156 µM y un testigo de agua destilada durante 30 y 180 min en medio de cultivo Carolina (Carolina Biological Supply) de talidomida (ICN 158753). Al terminar los tiempos de tratamiento, la trampa fue retirada del vaso y las larvas fueron lavadas brevemente en agua corriente con ayuda de una pisseta.

Para los experimentos de letalidad, teratogénesis, fertilidad, y mutación y recombinación somática se retiró la gasa cuidadosamente sin lastimar a las larvas y fue colocada directamente sobre medio de cultivo fresco dentro de un frasco de vidrio para permitir a las larvas continuar su desarrollo. Para la evaluación de la letalidad y teratogénesis los adultos emergidos de estos tratamientos fueron colectados y contados.

Para la evaluación de la fertilidad las moscas emergidas permanecieron en los mismos frascos durante cinco días permitiendo la maduración sexual y fecundación de las hembras. Posteriormente fueron transvasadas cada tres días en dos ocasiones a frascos con medio de cultivo nuevo para ovopositar. Al término del sexto día, las moscas P fueron retiradas y sacrificadas por sobreeterización para su análisis y los frascos con huevos fueron mantenidos en condiciones controladas hasta la emergencia de los adultos de primera generación filial (F1). Las moscas F1 fueron sacrificadas por sobreeterización y contabilizadas.

Para los estudios de cuantificación de proteína, GSH y GSSG, la gasa con larvas fue colocada en un tubo Falcon 10 mL y congelada rápidamente en nitrógeno líquido. Posteriormente 15 larvas de cada tratamiento fueron homogenizadas (20 golpes) en un homogenizador de vidrio con mango de teflón en 1 mL de Búfer A. La malla fue desechada y el homogenizado fue colocado en un tubo nuevo. Se tomaron 50 µL en un tubo nuevo para realizar la cuantificación de proteínas y fue congelado en nitrógeno líquido hasta su cuantificación. A los 950 µL de homogenizado restantes se le añadió el mismo volumen (950 µL) de Buffer B, se agitó y centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. Al término, 1.7 mL de sobrenadante fueron colocados en un tubo limpio y congelados en nitrógeno líquido hasta la cuantificación de GSH y GSSG (no más de 5 días), mientras el tubo con la pastilla del centrifugado fue desechado.

Mutación y Recombinación Somática

Los marcadores genéticos utilizados en SMART son: *mwh*: *multiple wing hair*, (0.03 µM) gen recesivo que provoca la aparición de múltiples tricomas por célula en las alas; *flr*³ (38.8 µM) gen recesivo letal en homocigosis pero que en mosaicos somáticos produce tricomas con forma de flama en las células del ala; TM3 (*In (3LR)TM3: ri pp sep bx34e e Bd*^S), cromosoma 3 balanceador con múltiples inversiones usado para el mantenimiento de *flr*³ e incapaz de recombinar con su homólogo; *Ser*, gen dominante presente en TM3 que produce alas con bordes aserrados; *e*: *ebony*, gen recesivo presente en TM3 que produce moscas con cuerpo oscuro (Lindsley y Zimm, 1992) (**Fig. A1**).

Moscas hembras vírgenes *flr*³/TM3 fueron aisladas por observación del meconio (Barron, AB, 2000) y cruzada con machos homocigos (*mwh,e/mwh,e*), la cruce fue dejada madurar durante 5 días y posteriormente se

sincronizaron los cultivos. Larvas de 72 ± 2 h de edad se extrajeron por flotación con sacarosa (Nöthinger, 1970). Los adultos que emergen de estos tratamientos consisten en dos tipos de progenie distinguibles, las moscas portadoras de balanceador (TM3/ *mwh,e*) en las que no se recuperan eventos viables de recombinación y de cuerpo oscuro y alas con muescas y las moscas no portadoras o libres de balanceador (*flr³/mwh,e*) en las que se recuperan eventos de recombinación y poseen fenotipo silvestre (Fig. A2). Estas moscas de fenotipo silvestre fueron sacrificadas por sobreeterización y conservadas en etanol 70%. Para cada tratamiento, fueron colocadas con pinzas de disección 40 alas de 10 hembras y 10 machos en un portaobjetos con goma Fauré. Los portaobjetos se dejaron secar al aire libre por 5 días y fueron prensados durante 3 días con una gota de Fauré y un cubreobjetos, finalmente se sellaron con barniz transparente etiquetaron y almacenaron en cajas de polietileno. Se revisaron 120 alas por tratamiento a 400X en microscopio óptico (Nikon YS100) y las manchas o grupos de tricomas fueron registradas por los marcadores fenotípicos *flr³* o *mwh*, por su región en el ala y por el número de tricomas involucrados en cada una.

Se calculó la frecuencia de manchas totales por ala, de manchas sencillas pequeñas (1 ó 2 céls. *flr³* o *mwh*), sencillas grandes (>3 céls. *flr³* o *mwh*) y gemelas (*flr³* y *mwh*) dependiendo del número de células involucradas y el tipo de tricomas. Cada tipo de mancha refleja la ocurrencia de un evento genético determinado (Fig.A3), por ejemplo, las manchas gemelas pueden recobrase por recombinación entre el centrómero y *flr³*. Las manchas sencillas *mwh* pueden producirse por mutación puntual, delección, no disyunción o por la recombinación entre *flr³* y *mwh*. Las manchas *flr³* pueden ser producidas por mutación, delección, o por la ocurrencia de recombinación en dos sitios: entre *flr³* y *mwh* y entre *flr³* y el centrómero. Las manchas generadas en moscas portadoras del balanceador TM3 pueden ser producto de mutación, delección o no disyunción pero no de recombinación pues no existe homología entre TM3 y el cromosoma 3, sin embargo, en moscas libres del balanceador las manchas pueden ser producto de mutación, delección, no disyunción o recombinación. La diferencia en la frecuencia de manchas en las moscas portadoras y libres de inversión es la proporción de manchas generadas por recombinación.

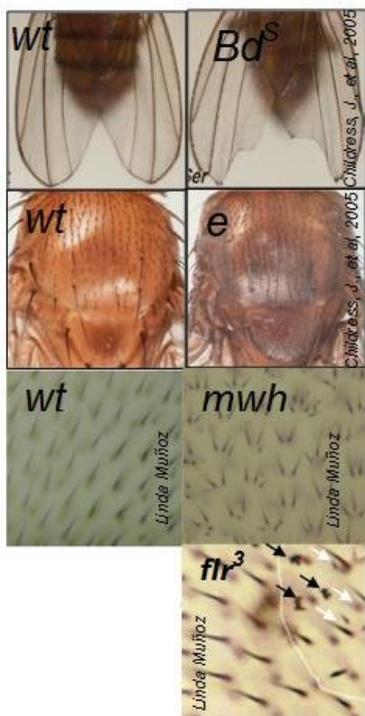


Fig. A1. Marcadores genéticos utilizados en la Prueba de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en ala en *Drosophila melanogaster*. *wt*= Forma de ala, color de cuerpo y tricoma de fenotipo silvestre; *Bd^S*= Forma de ala aserrada; *e*= Color de cuerpo ébano; *mwh*= Tricomas múltiples en ala, flechas claras; *flr³*=Tricomas en forma de flama, flechas oscuras.

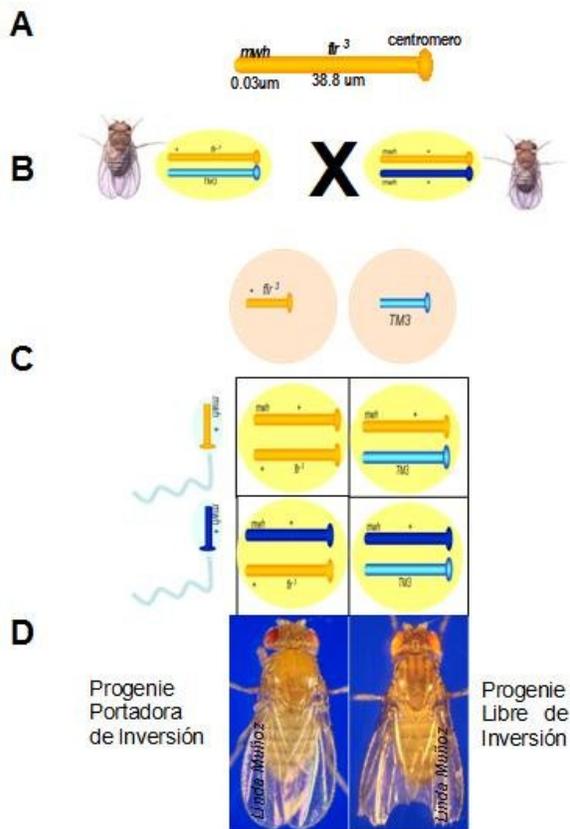
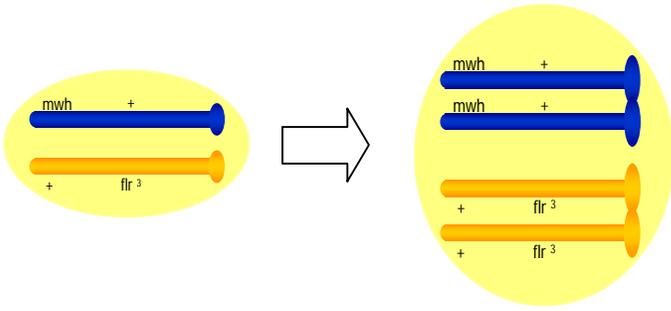
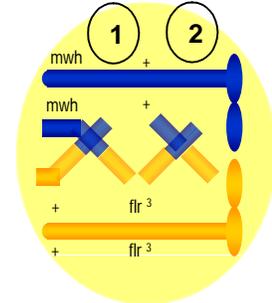


Fig. A2. Esquema de la cruce utilizada en la Prueba SMART en *D.melanogaster*. **A** Ubicación de los genes utilizados en SMART en el brazo izquierdo del cromosoma 3. **B** Genotipo de los progenitores. **C** Cruza y genotipo de la progenie resultante. **D** Fenotipo de la progenie resultante.



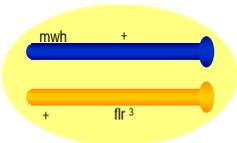
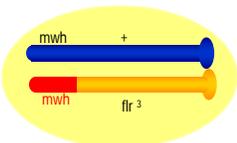
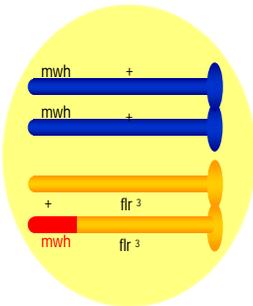
Recombinación

La recombinación puede ocurrir entre ambos marcadores (1), entre *flr³* y el centromero (2) o en ambos sitios (1 y 2).



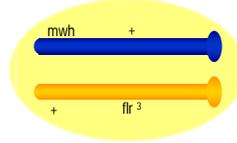
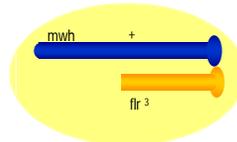
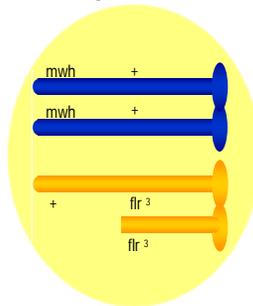
Mutación

Pueden generarse tanto manchas formadas por células de fenotipo *mwh* o *flr³*



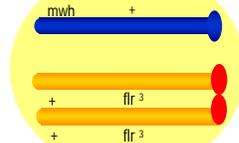
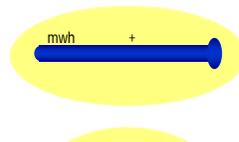
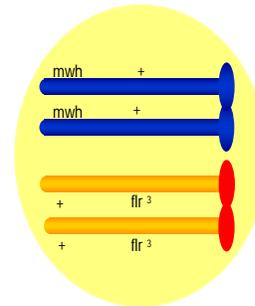
Delección

Pueden generarse tanto manchas con células de fenotipo *mwh* o *flr³*, sin embargo estas últimas son menos probables por la posición del gen

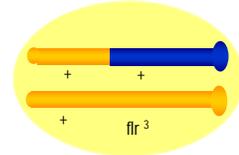
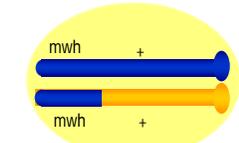


No Disyunción

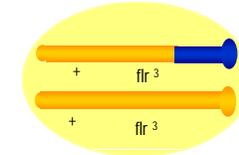
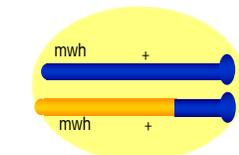
Únicamente pueden obtenerse manchas de células *mwh*, pues las células aneuploides *flr³* no proliferan



1



2



1 y 2

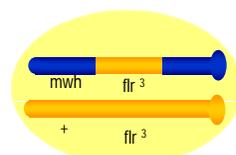
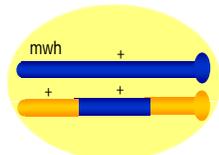


Fig. A3. Tipos de manchas que generan los distintos eventos genéticos terminales que ocurren en las células del disco imagal de ala en larvas de *Drosophila melanogaster* libres de inversión en la prueba SMART.

Cuantificación de Proteínas Totales

El homogenado congelado en nitrógeno líquido fue llevado a temperatura ambiente. Para cada tratamiento, 10 μL de este fueron mezclados con 950 μL de solución de Bradford en una placa de microtitulación de 96 pozos, y después de una incubación de 15 min en oscuridad, se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. Paralelamente, una curva de BSA (Albúmina de Suero Bovino) (SIGMA B4287) con concentraciones conocidas y preparada de la misma forma, fue leída a la misma absorbancia, se calculó la ecuación de la recta de regresión lineal y se intrapolaron las absorbancia de las muestras para calcular la concentración de proteína en cada una de las muestras.

Cuantificación de GSH

Los homogenados de cada una de las muestras fueron descongelados a temperatura ambiente y 100 μL de cada uno fueron puestos en dos tubos de reacción, a un tubo se le agregaron 50 μL de Ácido Tricloroacético (Baker 76039) al 5% (TCA5%) en RQB (Redox Quenching Buffer) mientras al segundo tubo se le agregaron 25 μL de TCA 5% y 25 μL de NEM (SIGMA). A ambos tubos se agregaron 250 μL de Buffer de Fosfatos pH7 1 M y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, 1 mL de Buffer de Fosfatos 0.1 M pH 6.9 y 150 μL de OPT (SIGMA P0657) fueron agregados a ambos e incubados durante 30min en oscuridad. Al término del periodo de incubación la fluorescencia fue leída en un fluorómetro (FluoroSkan Ascent, ThermoScientific) con 355 nm de Excitación y 460nm de Emisión. Adicionalmente, fue leída la fluorescencia, tanto en alícuotas con NEM como sin NEM de una curva patrón de concentraciones conocidas de GSH en TCA 5% en RQB. La curva patrón (**Fig. A4**) fue realizada, utilizando dos soluciones estándar de GSH (SIGMA G4251) 1 mg/mL y 0.1 mg/mL en TCA 5%. Para esto, una solución de GSH 1 mg/mL fue preparada y 25 mg/mL de zinc fueron añadidos. La mezcla fue agitada, centrifugada a 1600 rpm durante 1min, filtrada (0.2 μm) y diluida a 0.1 mg/mL con TCA 5%. La fluorescencia emitida por el complejo OPT-GSH fue estimada calculando la diferencia entre la fluorescencia de los tubos sin NEM y la de los tubos con NEM, tanto para las muestras como para la curva patrón. Se calculó la recta de regresión lineal para la diferencia de la fluorescencia de los tubos con NEM y sin NEM de la curva patrón de GSH en TCA% 5 y se estimó la concentración de GSH en los homogenados de las muestras, intrapolarando el valor de la diferencia de los tubos con NEM y sin NEM de las muestras.

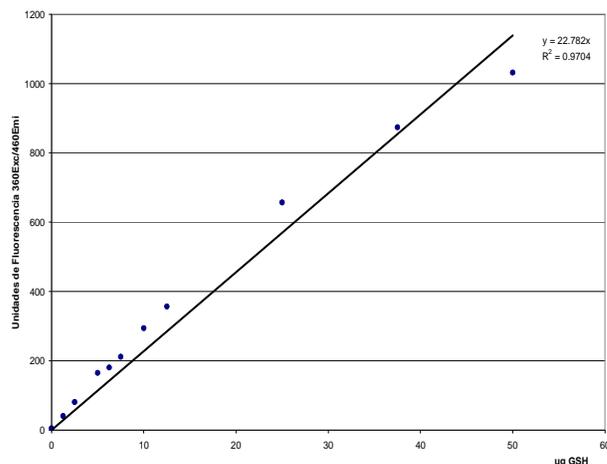


Fig. A4. Curva patrón de fluorescencia de concentraciones conocidas (ug) de GSH.

Cuantificación de GSSG

Los homogenados de cada una de las muestras fueron descongelados a temperatura ambiente y 100 μL de cada muestra fueron colocados en dos tubos de reacción, a cada tubo se le agregaron 50 μL de TCA 5%, 25 μL de NEM y 250 μL de PBS 1 M y se incubaron durante 5 minutos. Posteriormente, a un tubo de las muestras se agregó 30 μL de DT (SIGMA 157953), mientras al otro 30 μL de TCA 5% e incubados durante 60minutos. Al término del tiempo de incubación, a todos los tubos se agregó 1mL de PBS 0.1 M y 150 μL de OPT y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. La fluorescencia de cada uno de los tubos de reacción fue leída en un fluorómetro (Fluoroskan AFCENT, ThermoScientific) con una excitación de 355 nm y una emisión de 460 nm de longitud de onda. Paralelamente, la fluorescencia de una curva de concentraciones conocidas de GSSG (SIGMA G4376) fue leída en las mismas condiciones y bajo el mismo procedimiento que los tubos

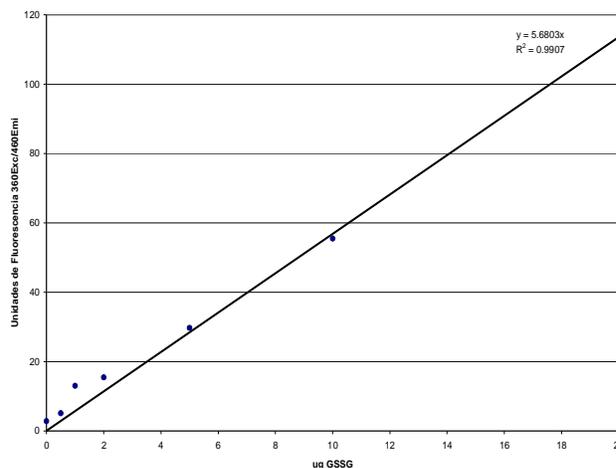


Fig. A5. Curva patrón de fluorescencia de concentraciones conocidas (ug) de GSSG.

experimentales. La curva patrón (**Fig. A5**) fue realizada utilizando un solución de GSSG 1 mg/mL y 0.1 mg/mL en TCA5%. La fluorescencia emitida por el complejo OPT-GSH formado por la reducción del GSSG a GSH, fue estimada calculando la diferencia entre la fluorescencia de los tubos con DT y la de los tubos sin DT, tanto para las muestras como para la curva patrón. Se calculó la recta de regresión lineal para la diferencia de la fluorescencia de los tubos con DT y sin DT de la curva patrón de GSSG en TCA 5% y se estimó la concentración de GSSG en los homogenados de las muestras, intrapolando el valor de la diferencia de la fluorescencia de los tubos con DT y DT NEM de las muestras. Los resultados fueron reportados como el contenido de GSSG (μg) de 15 larvas.

Experimentos in Vitro

Las alícuotas congeladas de células (0.5 mL) fueron llevadas a temperatura ambiente y puestas en 10 mL medio de cultivo 1x en un tubo Falcon (15 mL), centrifugadas, y resuspendidas en 5 mL de medio de cultivo. Las células fueron mantenidas en medio M3. El stock de líneas celulares fue mantenido en T-Flask (5 mL) y los cultivos en crecimiento para experimento en cajas de Petri plásticas (10 mL y 4 mL) en una incubadora con aire como fase gaseosa a 27°C. Los cultivos celulares fueron mantenidos a una concentración entre $0.5\text{-}2.0 \times 10^6$ cels por mL de medio. Los cultivos fueron diluidos al menos 1:5 cada cinco días o cuando las células alcanzaban una densidad de 10×10^6 cels por mL. Clonas celulares de crecimiento lento que no podían ser diluidas en esa relación fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en medio fresco.

Los cultivos celulares S2S fueron tratados con diluciones sucesivas de una solución fresca de 156 μM talidomida (SIGMA T144) en las concentraciones 156, 0.156 y 0 μM (testigo de agua destilada) de talidomida durante 30 y 180 min en medio de cultivo M3. Las células en cultivo fueron diluidas 1:1 con una solución de talidomida 0.3125 mM y 0.0003125 mM para obtener la concentración deseada y un volumen total de 10 mL. Después del primer tratamiento (30 min) la mitad del volumen fue transferido a un tubo limpio (Falcon Tube, 15 mL), centrifugado 2000 rpm 5 min a 4°C y resuspendido en diferentes solventes, dependiendo de la variable de respuesta a seguir. Para aislar RNA fue resuspendido en Trizol®, para inmunotinción fue resuspendido en medio de cultivo M3 y para evaluar la viabilidad celular, el contenido de proteína, de GSH y de GSSG, fue resuspendido en 500 μL de Buffer A tomando una alícuota en un tubo de microcentrifuga para evaluar la viabilidad celular, otra en una placa de microtitulación para cuantificar el contenido de proteína y el resto fue reservado para la determinación de GSH y GSSG agregando el mismo volumen de Buffer B y centrifugando a 14 000rpm por 20 min a 4°C, el sobrenadante fue filtrado a 0.45 μM y el homogenado fue conservado a -70°C hasta su cuantificación por menos de una semana.

Citotoxicidad

Una alícuota de 100 μL de la solución de células tratadas en un tubo Eppendorf fue mezclada con 10 μL de solución MTT (5 mg/1mL; SIGMA M5655) esterilizada por filtración (0.2 μM) y con 800 μL de medio de cultivo para un volumen final de 1 mL. La muestra fue incubada 3 h a 27°C y después de esto, 100 μL de la solución de lisis fueron agregados (0.1 N HCl en isopropanol absoluto). El tubo fue agitado en vortex (30 min) hasta la completa disolución de los cristales de formazan y la absorbancia a 570 nm y 690 nm fue leída en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pozos (SpectraMax Plus). La absorbancia se expresa como Abs570-Abs690 y la viabilidad celular es una función de la absorbancia 100% de células viables.

Cuantificación de proteínas totales

5 μL de la solución de células resuspendidas en Bufer A fueron tomados y puestos en una placa de microtitulación y 30 μL de la Solución A del kit fueron añadidos. 200 μL de la Solución B del kit fueron agregados a cada pozo, mezclados e incubados por 15 min en la oscuridad. La absorbancia a 750 nm fue obtenida y la concentración de proteínas fue determinada usando como referencia una curva estándar hecha con BSA.

Cuantificación de GSH

100 μL del homogenizado congelado fueron puestos en dos tubos. A un tubo se agregaron 50 μL de TCA 5%. Al segundo tubo se agregaron 25 μL TCA 5% y 25 μL de NEM. Se agregaron 250 μL de Bufer de Fosfatos 1 M pH 7 a ambos tubos y fueron incubados 5 min a temperatura ambiente. 1ml de Bufer de Fosfatos 0.1 M pH 6.9 y 150 μL de o-phthaladehyde (OPT) (5 mg/mL en metanol) fueron agregados a cada tubo. Las muestras fueron incubadas 30 min en oscuridad a temperatura ambiente y la fluorescencia fue leída a 360 nmEXC/460 nmEMM en un fluorómetro de placas de microtitulación de 96 pozos (FluoroSkan Ascent, ThermoScientific). Adicionalmente, una curva patrón fue realizada con diferentes diluciones de GSH en TCA5%. Para realizar la

curva patrón, se preparó GSH 1 mM y se le agregaron 25 mg de zinc a 1mL de GSH 1 mg/mL, se mezcló con vortex, se centrifugó a 1600 rpm 1 min, se filtró (0.2 μ m) y se diluyó a 0.1 mg/mL con TCA-RQB. La concentración de GSH fue calculada como la diferencia entre la absorbancia en los tubos sin NEM y la absorbancia de los tubos con NEM. Estos valores fueron intrapolados a la curva patrón.

Cuantificación de GSSG

100 μ L del homogenado estable fueron puestos en dos tubos. 50 μ L de TCA 5%, 20 μ L de NEM, y 250 μ L de PBS 1 M fueron agregados a ambos tubos e incubados por 5 min a temperatura ambiente. A uno de los tubos se le agregaron 30 μ L de TCA5%, mientras al otro tubo se le agregaron 30 μ L de DT (SIGMA 157953) 100 mM en RQB. Ambos tubos fueron incubados por 60 min a temperatura ambiente y entonces 50 μ L PBS 0.1 M y 50 μ L de OPT fueron añadidos. Los tubos fueron incubados por 30 min en oscuridad y se leyó la absorbancia 360 nmEXC/460 nm EMM (FluorosKan AFCENT, ThermoScientific). Adicionalmente, una curva patrón fue realizada con diferentes concentraciones de GSSG (0.1 mg/mL) en TCA-RQB. La concentración de GSSG de la muestra fue calculada como la absorbancia en los tubos con DT sustrayendo la absorbancia de los tubos sin DT. La regresión lineal de la curva patrón fue obtenida y la absorbancia de las muestras intrapolada en la curva para obtener la concentración de GSSG.

Inmunotinción de H2A.x

Las células tratadas fueron resuspendidas y diluidas en medio de crecimiento M3 en una densidad de 200,000 cells/mL. 50 μ L de la suspensión celular (alrededor de 10,000 células) fueron añadidos a cada pozo de un portaobjetos impreso con teflón (Teflon Printed Slides 10 pozos, Ø5mm, negros, 1mm grosor) previamente limpio y se incubaron 20 min a temperatura ambiente para permitir que las células se dispersaran. Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS por 10 min. Los pozos fueron lavados con PBS 1X por 2 min y las células fueron permeabilizadas para la tinción usando TBS adicionado con Triton-100 10% por 2 min. Los pozos fueron lavados 3 veces (1 min cada vez) con PBS 1X y fueron bloqueados con medio M3 (suplementado con FBS) por 1h a temperatura ambiente. Los pozos fueron incubados con anticuerpo primario contra la histona H2A.x (1:500 anti- H2A.x, Upstate Biotechnology) toda la noche a 4°C en M3. El anticuerpo primario fue removido y los pozos fueron lavados una vez más con medio M3. Se agregó anticuerpo secundario (1:2000) Alexa Fluor goat anti-mouse 488 (Molecular Probes, Eugene OR) en medio M3 en oscuridad por 2h a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados 10min en PBS y se añadió medio de montaje VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) que contiene 1.5 μ g/ml 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) para la tinción de ácidos nucleicos y por tanto, delimitación del núcleo celular. El cubreobjetos fue sellado con barniz transparente, marcado para su identificación y guardado a 4°C dentro de una caja hermética de plástico. Imágenes de las células fueron capturadas en un microscopio Nikon PCM 2000 Confocal System a 400X (Nikon USA, New York) a 528 nm (FITC) y a 427 nm (DAPI). Se realizaron dos experimentos independientes, con 3 pozos por tratamiento, se tomaron 5 pares de imágenes por cada pozo a 200X conteniendo entre 10 y 30 células por imagen. Con el fin de evitar señales del anticuerpo falsas se determinó como células positivas a H2A.x a las células que presentaron fluorescencia mayor a 12 en una escala arbitraria de 0 a 25 establecida por el software Metamorph 6.2. Las imágenes fueron analizadas en este software para determinar el número de células presentes basados en la imagen teñida por DAPI y el número de células fluorescentes (positivas a H2A.x) basados en la imagen FITC.. Se calculó la media de las proporciones de células positivas a H2A.x respecto al número de células totales. Los resultados fueron reportados como la proporción promedio de células positivas para H2A.x.

Cuantificación de RNAm de GSH2

Aislamiento. 5-7 X10⁶ células tratadas fueron centrifugadas y resuspendidas en 500 μ L de Trizol® (Tri Reagent Sigma T-9424). La pastilla de células fue homogenizada usando un homogenizador de teflón (15 vueltas) y por pipeteo. La muestra fue centrifugada 12000 rpm 3 min a temperatura ambiente y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo para remover el debris celular. Se agregaron 11 μ L de cloroformo, se agito con vortex (23 sec) e incubó a temperatura ambiente por 2 min. El tubo fue centrifugado 12000 rpm por 15 min a 4°C. Después de este paso la muestra en el tubo se divide en tres fases, la fase acuosa superior contiene RNA, la fase gelatinosa intermedia contiene DNA genómico y la fase inferior de color rosa contiene proteínas y compuestos orgánicos. La capa acuosa superior (alrededor de 50-60% del volumen original de Trizol® usado) fue transferida a un tubo nuevo teniendo cuidado de no tocar la interfase y fue precipitada con alcohol isopropílico (250 μ L) por 10 min a temperatura ambiente antes de ser centrifugado 12000rpm por 10min a 4°C. El sobrenadante fue removido y la pastilla fue lavada con 500 μ L de etanol al 75% (sacado del congelador). La muestra fue centrifugada 12000 rpm por 1min a temperatura ambiente y secada al aire por 5-15 min. La pastilla fue resuspendida en 100 μ L de agua DEPC por 16 min a 60°C. La absorbancia fue leída (260, 280 and 230) en espectrofotómetro (Nanodrop 1000, ThermoScientific) (2 μ L de la muestra) y la concentración de RNA fue

obtenida. La relación 260/280 y 260/230 fueron calculados. 17 μL de la muestra más 3 μL de buffer de corrida 6X fueron corridos en un gel de agarosa 1% (Sigma) con TAE teñido con Bromuro De Etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y visualizado usando un transiluminador UV Fluorochem. Un marcador de peso molecular de DNA (DNA Molecular Weight Marker IX, ROCHE, 11449460001) fue analizado con la muestra. Obtención de cDNA. El RNA aislado fue tratado con DNAasa I para eliminar cualquier DNA presente en la muestra. 1 μL de Buffer DNAasa I 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 20 mM MgCl_2) fue añadido a 5 μg de RNA aislado (menos de 9 μL). 1 μL de DNAasa I (DNAasa I Recombinante, ROCHE) y agua DEPC fueron añadidos para un volumen final de 10 μL . La mezcla fue incubada 15min a temperatura ambiente y la DNAasa I fue inactivada añadiendo 1 μL de EDTA 25 mM y calentada 10 min a 65°C. Una unidad de DNAasa I es suficiente para tratar 10 μg de RNA. Es importante no sobrepasar 10 min a 65°C de incubación porque temperaturas mayores o mayores tiempos pueden inducir la hidrólisis de RNA dependiente de Mg^{++} . El EDTA añadido debe ser al menos 2 mM antes de la inactivación por calor para evitar la hidrólisis de RNA. 10 μL de RNA purificado fueron agregado a 3 μL de hexameros al azar o de primers PoliA (IDT-DNA, 10 μg /50 μL) y 30 μL de agua estéril. La mezcla fue incubada 10 min a 65°C e inmediatamente fue puesta en hielo. 4 μL de Buffer para PCR 10X, 5 μL de una mezcla de dNTP 1:1:1:1, 6 μL de MgCl_2 25 mM y 0.5 μL de Retrotranscriptasa (MultiScribe RetroTranscriptase, Applied Biosystems) fueron agregados a la muestra. La mezcla fue incubada por 10 min a 25°C, 1 h a 42°C, 2min a 95°C y 2 min a 4°C. PCR Un primer sentido (5'-TGT CCA GCG ACG CCA ATA CGG-3', Tm62.2C, IDTDNA, Integrated DNA Technologies) fue seleccionado en el primer exon del gen de GSH2 y un primer contrasentido (5'- TGA ACA GAT TGG CCG TGA ACT CGT-3') fue seleccionado en el segundo exon generando un producto de 333pdb. La reacción de PCR fue hecha de acuerdo con el manual del kit 2X PCR Master Mix (Fermentas). 12.5 μL de la mezcla 2X PCR Master Mix fueron añadidos a 1 μL de cada primer, 2 μL de cDNA templado y 8.5 μL agua libre de nucleasas. La PCR fue realizada 2 min@ 95°C, 40 ciclos (30seg@95°C, 30 seg@60°C, 30 seg@72°C), una extensión final de 5 min@72°C, y un ciclo mantenido a 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados en un gel de agarosa-TAE al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para corroborar la amplificación se utilizaron primers de actina de *D. melanogaster* (primer sentido: 5'- AAG CGT GGT ATC CTC ACC CTG AAG TA-3'; primer contrasentido: 5'-CAC GCA GCT CAT TGT AGA AGG TGT-3').